

Charakterisierung endogener und synthetischer Androgenrezeptor-Corepressoren zur Hemmung des Wachstums von Prostatakrebszellen

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Diplom-Biologin Claudia Gerlach
geboren am 13.06.1983 in Gera**

Gutachter

- 1. Professor Dr. rer. nat. Aria Baniahmad, Institut für Humangenetik,
Universitätsklinikum Jena**
- 2. PD Dr. rer. nat. Christian Melle, Arbeitsgruppe Biomolekulare Photonik,
Universitätsklinikum Jena**
- 3. PD Dr. rer. nat. Marcus V. Cronauer, Arbeitsgruppe Molekulare
Endokrinologie, Universitätsklinikum Ulm**

Tag der öffentlichen Verteidigung: 04.11.2014

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Zusammenfassung	IX
2 Einleitung	01
2.1 Androgenrezeptor (AR) Struktur und Funktion	01
2.2 Mechanismen der Prostatakrebs (PCa)-Progression	06
2.3 Der ligandenabhängige Corepressor LCoR als Grundlage neuartiger CoR	09
2.4 Peptidaptamer-basierte CoR	10
2.5 Generierung zellpermeabler Corepressorpeptide	12
2.6 Zielsetzung	13
3 Material und Methoden	15
3.1 Substanzen, Software, Plasmide, Antikörper	15
3.2 Zelllinien	16
3.3 Bakterielle Biosynthese rekombinanter Proteine	16
3.4 Extraktion und Affinitätsaufreinigung GST-fusionierter Proteine	17
3.5 Extraktion und Affinitätsaufreinigung His-fusionierter Proteine	18
3.6 GST-Pulldown	18
3.7 Herstellung eukaryotischer Ganzzellextrakte und Proteinkonzentrationsbestimmung	19
3.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	19
3.9 Coomassie-Färbung	20
3.10 Westernblot-Analysen	20
3.11 Reportergenassays	21
3.12 Zytometrische Analyse des Zellzyklus	21
3.13 Apoptose-Analyse	22
3.14 Detektion zellulärer Seneszenz	22

4 Ergebnisse	23
4.1 Einfluss von Androgenen und <i>Src-Signaling</i> auf die endogene Repressionsfunktion von LCoR und dessen Bindung an den AR	23
4.1.1 Bestätigung der direkten Interaktion zwischen AR-DBD und LCoR	23
4.1.2 <i>Src-Signaling</i> und Androgene beeinflussen die Interaktion zwischen LCoR und AR	25
4.1.3 <i>Src-Signaling</i> und Androgene regulieren die LCoR-Repression	26
4.1.4 Identifizierung der an der LCoR-Repression beteiligten AR-Domänen in CV1-Zellen	28
4.1.5 Konstitutiv-aktives Src erhöht die LCoR-Repression	32
4.1.6 Ras ist an der Src-vermittelten LCoR-Funktionssteigerung in C4-2-Zellen beteiligt	35
4.1.7 Die LCoR-Repression kann in C4-2-, im Gegensatz zu LNCaP-Zellen durch zusätzliches LCoR gefördert werden	36
4.1.8 <i>Src-Signaling</i> und Androgene verändern die Proteinmengen von AR, LCoR und Src	37
4.1.9 Herstellung neuartiger CoR	40
4.2 Aufreinigung der PAB-CoR-Peptide und Funktionsanalyse in PCa-Zellen	41
4.2.1 Einfluss von AR-Liganden auf die Interaktion zwischen GST-9R-524 und dem AR	41
4.2.2 Wirkung der 9R-fusionierten PAB-CoR Konstrukte auf die Transaktivierung des wtAR und der AR-Mutanten	43
4.2.3 Einfluss aktiver PKA auf die 9R-524 und 9R-513 vermittelte Repression der AR-Transaktivierung	44
4.2.4 Aufreinigung der PAB-CoR-Peptide als His-Fusion mittels Nickel (Ni)-NTA-Agarose	46
4.2.5 Aufbereitung der PAB-CoR-Peptide für die funktionellen Analysen in Zellkultur	50
4.2.6 Optimierung der Aufreinigungs- und Dialysebedingungen nach Austausch der PTD 9R durch TAT	54

4.2.7	Einfluss der TAT-fusionierten PAB-CoR-Peptide auf Wachstum, Apoptoserate, Zellzyklus und zelluläre Seneszenz.....	60
4.2.8	Wirkung der TAT-fusionierten PAB-CoR-Peptide auf die Menge AR-regulierter und Zellzyklus-assoziiierter Proteine.....	72
5	Diskussion.....	79
5.1	In C4-2-Zellen steigert Src-Signaling die LCoR-AR-Interaktion sowie die LCoR-Repression.....	79
5.2	In LNCaP-Zellen hemmt Src-Signaling die R1881-verstärkte LCoR-Funktion.....	82
5.3	Optimierung der PAB-CoR-Peptid Isolierung für eine konstantere AR Inhibierung.....	83
5.4	Erhöhung der PAB-CoR-Peptid Löslichkeit.....	84
5.5	TAT-513 hemmt die LNCaP-Zellproliferation effizienter und spezifischer als TAT-524 und führt in LNCaP-Zellen neben dem G1-Arrest zur Apoptose-Induktion.....	85
5.6	TAT-513 reguliert in LNCaP-Zellen, spezifischer als TAT-524, wichtige Zellzyklusfaktoren vermutlich durch Inhibierung des ARs.....	86
5.7	TAT-513 inhibiert das Wachstum der C4-2-Zellen auch effizient und ebenfalls in Abhängigkeit des ARs, während TAT-524 unspezifisch wirkt.....	89
5.8	TAT-513 zeigt das größere Potenzial zur AR Inhibierung, wobei AR-T877A durch beide PAB-CoR-Peptide vor allem in Gegenwart von R1881 gehemmt wird.....	91
5.9	Aussicht.....	93
6	Schlussfolgerung.....	95
7	Literaturverzeichnis.....	97
8	Anhang.....	116
8.1	Zusätzliche Daten.....	116
8.2	PAB-CoR AS-Sequenzen.....	118
8.3	Ehrenwörtliche Erklärung.....	119
8.4	Danksagung.....	120

Abkürzungsverzeichnis

α	Alpha, anti
9R	9 Argininreste
A	Ampere (Stromstärke)
Abb.	Abbildung
ADT	Androgendepletionstherapie
AF	Aktivierungsfunktion
AGR 2	<i>Anterior Gradient 2</i>
AKR1C3	<i>Aldo-Keto Reductase Family 1 Member C3</i>
Amp	Ampicilin
ANT1	Adenin Nukleotid Translokase Typ 1
AR	Androgenrezeptor
ARA	AR assoziiertes Protein 160
ARE	<i>Androgen Response Element</i>
ART 27	<i>Androgen Receptor trapped clone-27</i>
AS	Aminosäure
B	<i>Beads</i>
BCL 2, 6	<i>B-cell Lymphoma 2, 6 Protein</i>
Bfl1	<i>BCL-2-related Protein A1</i>
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
C	Carboxy
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cAMP	<i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i>
CARM1	Coaktivator-assoziierte Arginin Methyltransferase 1
Cas	Casodex, Bicalutamid
CBB	<i>Coomassie Brilliant Blue</i>
CBP	<i>CREB (CAMP Response Element binding) Protein</i>
CDK	<i>Cyclin dependent Kinase</i>
CoA	Coaktivator
CoR	Corepressor
CPA	Cyproteronacetat
ChIP	Chromatin Immunpräzipitation

CRPC	<i>Castration Resistant Prostate Cancer</i>
CSS	<i>Charcoal Stripped Serum</i>
CtBP	C-terminal bindendes Protein
CV-1	<i>Green Monkey Kidney Cell Line</i>
C4-2	PCa-Zelllinie, androgenunabhängiger Abkömmling der LNCaP-Zellen
Da	Dalton [g/mol]
DBD	DNA-Bindedomäne
DHT	Dihydrotestosteron
DMEM Medium	<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DP	Dialysepuffer
DTT	Dithiothreitol
E	Eluat
E2F1	E2 Transkriptionsfaktor 1
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF(R)	<i>Epidermal Growth Factor (Receptor)</i>
ER	<i>Estrogen Receptor</i>
ErbB2,3	<i>Avian Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog 2, 3 (EGFR)</i>
et al.	<i>et alii</i> – und andere
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
f.l.	<i>full length</i>
FS	Flufenaminsäure
FSC	<i>Forward Scatter</i>
G1/2	<i>Gap 1/2 Phase des Zellzyklus</i>
Gal	Galaktosidase-DNA-Bindedomäne
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
G-HCl	Guanidin-Hydrochlorid
GST	Glutathion-S-Transferase
GZE	Ganzzellextrakt
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase

HEBS	HEPES-gepufferte Salzlösung
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-iperazinylethansulfonsäure
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
His	Histidin
HPV	Humanes Papillomavirus
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
HSD17B6	Hydroxysteroid (17-Beta) Dehydrogenase 6
HSP	Hitzeschockprotein
HTH	<i>Helix turn Helix</i>
ID1	<i>Inhibitor of DNA binding 1</i>
IGF	<i>Insulin-Like Growth Factor</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
KGF	<i>Keratinocyte Growth Factor</i>
KHR	Kernhormonrezeptoren
KLF 6	<i>Krüppel like Factor 6</i>
lacZ	Beta-Galactosidase
LB	Luria Bertani
LBD	Ligandenbindedomäne
LCoR	Ligandenabhängiger Corepressor
LNCaP	<i>Lymph Node Prostate Cancer Cell Line</i>
LSD 1	<i>Lysine specific Demethylase 1</i>
luc	Luziferase
M	Molar
M-Phase	Mitose-Phase des Zellzyklus
m	Milli
μ	Mikro
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MDV3100	Enzalutamid
min	Minuten
MMP	Matrix Metallo Proteinase
MMTV	<i>Mouse Mammary Tumor Virus</i>
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
MW	Molekulargewicht
N	Amino
NaBu	Natriumbutyrat
N-C-Interaktion	Interaktion zwischen Amino (N)- und Carboxy (C)-Terminus
NCoR	<i>Nuclear Receptor Corepressor</i>
NETN	Natriumchlorid, EDTA, TRIS, NP-40
Ni	Nickel

NLS	<i>Nuclear Localization Sequence</i>
NP-40	Nonidet P40; Ethylenphenyl-Polyethylenglycol (Tergitol)
NTA	Nitrilotriacetat
NTD	Aminoterminal Domäne
OD	optische Dichte
OH-F	Hydroxyflutamid
ONPG	o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid
P	Phospho
PA	Peptidaptamer
PAA	Polyacrylamid
PAB-CoR	Zellpermeabler Peptid Aptamer-basierter CoR
PBS	<i>Phosphate buffered Saline</i>
PCa	<i>Prostate Cancer</i>
PCAF	P300/CBP-assoziierter Faktor
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidylinositid-3-Kinase
PKA, PKC	Proteinkinase A, C
pKs	Säurekonstante
PMSA	<i>Prostate specific Membrane Antigen</i>
PP2	4-amino-5-(4-chloophenyl)-7-(t-butyl)-Pyrazolo(3,4-d)pyrimidine
P+R	PP2 + R1881
pRb	Retinoblastoma Protein
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PSMA	<i>Prostate specific Membrane Antigen</i>
PTD	Proteintransduktionsdomäne
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R1881	Methyltrienolon
Ras	<i>Rat Sarcoma Protein</i>
RNA	Ribonucleic Acid
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SA β -Gal	Seneszenz-assozierte Beta-Galactosidase
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SMRT	<i>Silencing Mediator for Retinoid or Thyroid Receptors</i>
Sox 2	<i>Sex determining Region Y (SRY) Box 2</i>

S-Phase	Synthese-Phase des Zellzyklus
Src	<i>Sarcoma</i> Tyrosinkinase
SRC1	<i>Steroid Receptor Coactivator 1</i>
SSC	<i>Sideward Scatter</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
SUMO	<i>Small Ubiquitin-like Modifier</i>
T	Testosteron
TAT	<i>Transactivator of Transcription</i>
TAU	<i>Transcription Activation Unit</i>
TFIIF/H	Transkriptionsfaktor 2 F/H
TBS	<i>TRIS buffered Solution</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TERT	<i>Telomerase Reverse Transkriptase</i>
TIF2	<i>Transcriptional Intermediary Factor 2</i>
TK	Thymidinkinase
TRIS	Hydroxymethyl)-aminomethan
TMPRSS2	Transmembranprotease, Serin 2
TRAP220	Thyroidhormon Rezeptor-assoziiertes Protein
TrxA	Thioredoxin A
TSPY	<i>Testis Specific Protein, Y-encoded</i>
u. a.	unter anderem
UAS	<i>Upstream Activation Sequence</i>
üN	über Nacht
V	Volt (Spannung)
Wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-Galactopyranosid
z. B.	zum Beispiel
%	Prozent
Δ	Delta

1) Zusammenfassung

Der Androgenrezeptor (AR) ist das primäre Ziel der Prostatakrebs (PCa)-Hormontherapie. Eine Hemmung der AR-Aktivität durch Verringerung der Androgene sowie Behandlung mit AR-Antagonisten inhibiert anfänglich das PCa-Wachstum. Das Problem einer Resistenzentwicklung erfolgt jedoch häufig und basiert auf einer zum Teil androgenunabhängigen Reaktivierung des ARs, welcher essentiell für das Tumorstadium ist und das hauptsächliche Angriffsziel bleibt. Die Mechanismen dieser sogenannten Kastrationsresistenz sind neben einer erhöhten intrakrinen Androgenproduktion sowie Mutationen des ARs auch dessen Überexpression. Diese und andere Veränderungen führen zu einem relativen Mangel an funktionellen AR-Corepressoren (CoR), welche den AR transkriptionell hemmen. Dieser Verlust bewirkt schließlich eine erhöhte AR Aktivierung.

Ziel der Arbeit ist es, das CoR-Defizit mit AR-spezifischen, zellpermeablen CoR-Peptiden, bestehend aus Fusionen mit einer Proteintransduktions (PTD)-, einer spezifischen AR-Binde- sowie einer Transrepressionsdomäne auszugleichen und so das Wachstum androgenabhängiger (LNCaP) und –unabhängiger (C4-2) PCa-Zellen zu hemmen.

Als spezifische AR-Bindedomänen wurden zwei Ansätze getestet. Zum einen diente der humane CoR LCoR als Grundlage. Es konnten zwei spezifische und voneinander unabhängig AR-bindende Regionen bestätigt werden. Außerdem wurde eine Verstärkung der LCoR-vermittelten Repression (LCoR-Repression) durch das Androgen R1881 festgestellt, wobei vermutlich die erhöhte Interaktion mit der AR-DNA-Bindedomäne verantwortlich ist. Aufgrund der sehr komplexen und gegensätzlichen Regulation in den humanen PCa-Zelllinien LNCaP und C4-2 durch die Interferenz mit der Kastrationsresistenz-assoziierten Src-Kinase stellte sich LCoR jedoch als ungeeignet zur konstanten AR Inhibierung heraus.

Hingegen zeigten zwei Peptidaptamer-basierte CoR (PAB-CoR)-Peptide sehr vielversprechende Effekte, wobei zunächst deren Expression sowie Aufreinigungseffizienz, die Optimierung der PTD-Sequenz und die Erhöhung der Löslichkeit im Vordergrund standen. Insbesondere PAB-CoR TAT-513 inhibierte effizient, spezifisch und gezielt das Wachstum der AR-positiven PCa-Zellen im nanomolaren Bereich. In LNCaP-Zellen konnte ein G1-Arrest, unabhängig von zellulärer Seneszenz, und die Induktion von Apoptose nachgewiesen werden. Diese Effekte sind wahrscheinlich auf eine Verringerung des AR-Proteins bzw.

dessen Funktion sowie damit einhergehend auf die Regulation AR-gesteuerter Zellzyklusproteine zurückzuführen.

Zusätzlich wurden eine Liganden-unspezifische AR-Punktmutante sowie eine konstitutiv-aktive Deletionsmutante, welche bei kastrationsresistenten Tumoren häufig auftritt, effizient gehemmt. Ein weiterer Vorteil besteht in der unveränderten AR Hemmung durch TAT-513 trotz einer aktiven Kastrationsresistenz-assoziierten Kinase. Darüber hinaus zeigte dieses PAB-CoR Peptid eine erhöhte AR-Bindung in Gegenwart von Androgenen. Mit diesen Eigenschaften könnten kastrations- und antagonistresistente PCa-Zellen vermieden bzw. gehemmt werden und so androgenunabhängiges Wachstum unterdrückt werden. Tatsächlich inhibierte TAT-513 das Wachstum der C4-2-Zellen ähnlich effizient wie das der LNCaP-Zellen.

Im Endeffekt konnte mit TAT-513 ein vielversprechender neuer Ansatz zur Inhibierung des PCa-Wachstums in Form eines zellpermeablen Peptids verwirklicht werden, welches als AR-spezifischer CoR dessen Funktion effektiv hemmt.

2) Einleitung

Das Prostatakarzinom (*PCa, Prostate Cancer*) ist das am häufigsten diagnostizierte Malignom und nach Lungenkrebs die zweithäufigste krebsassoziierte Todesursache bei Männern in den westlichen Industrieländern (Siegel *et al.*, 2012). Der Androgenrezeptor (AR) ist ein Vertreter der Klasse I Kernhormonrezeptoren (KHR) bzw. der Steroidhormonrezeptoren. Er fungiert somit als androgenabhängiger Transkriptionsfaktor (TF), welcher für die Entwicklung und Funktion der Prostata, aber auch für die PCa-Tumorgenese und -Progression eine zentrale Rolle spielt. Dementsprechend werden neben einem chirurgischen Eingriff und Strahlentherapie lokal fortgeschrittene Tumore sowie metastasierenden Stadien durch eine Androgen-Depletions-Therapie (ADT), mittels chemischer Kastration, in Kombination mit AR-Antagonisten behandelt. Letztere sollen für die vollständige Inhibierung der AR-Aktivität sorgen. Da die ADT nur die testikuläre und nicht die adrenale Androgensynthese hemmt, welche 10 % der Gesamtproduktion darstellt (Fuhrmann *et al.*, 1998; Labrie *et al.*, 1988), ist die Kombinationstherapie effektiver. Anfangs hemmt sie erfolgreich das Tumorstadium, jedoch entwickelt sich oft innerhalb von 18 bis 36 Monaten ein kastrationsresistentes PCa (CRPC, *Castration Resistant Prostate Cancer*)-Stadium aufgrund der androgenunabhängigen AR Reaktivierung (Knudsen und Kelly, 2011; Denmeade und Isaacs, 2002; Feldman und Feldman, 2001). Somit behält der AR, unabhängig von Androgenen, die übergeordnete Funktion in der Förderung der CRPC Zellproliferation (Garraway und Sellers, 2006; Liao *et al.*, 2005), wodurch die Suche nach neuen Mechanismen zur AR Inhibierung bei resistentem Tumorstadium von großer Bedeutung und der Ansatz dieser Arbeit ist.

2.1) Androgenrezeptor (AR) Struktur und Funktion

Das AR-Protein, kodiert durch acht Exons, ist 110 kDa groß und besteht aus vier funktionell verschiedenen Domänen (Abb. 2.1), der wenig konservierten N-terminalen Domäne (NTD), der hochkonservierten DNA-Bindedomäne (DBD), der Hinge-Region und der mäßig konservierten Liganden-Bindedomäne (LBD). Die 50 Aminosäure (AS) Hinge-Region trennt die DBD von der LBD und enthält eine Hälfte des zweiteiligen ligandenabhängigen *Nuclear Localization Signals* (NLS) für die Translokation in den Zellkern. Die NTD gilt als konstitutiv-aktiv und induziert die Transkription unabhängig von Androgenen in LBD-Deletionsmutanten (Jenster *et al.*, 1991; Simental *et al.*, 1991). Sie beinhaltet die Aktivierungsfunktion (AF)-1,

bestehend aus den *Transcriptional Activation Units* (TAU) 1 und 5 (Jenster *et al.*, 1995). Dabei ist Letztere anhand der *core* Sequenz WHTLF (AS 433-437) hauptsächlich für die konstitutive Transaktivierungsfunktion und 50 % der deregulierten AR-Aktivität in CRPC-Zellen verantwortlich (Dehm *et al.*, 2007). Die DNA-Bindung wird durch zwei Zinkfinger-Domänen realisiert, während die zweite außerdem die AR-Homodimerisierung vermittelt (Umesono und Evans, 1989). Die Ligandenbindung durch die LBD stellt einen primären Kontrollmechanismus der AR-Signaltransduktion dar. Ähnlich der AF-1 Region in der NTD, interagiert auch die in der LBD lokalisierte AF-2 mit LxxLL-haltigen Coregulatoren, wie z. B. Coaktivatoren (CoA) der *Steroid Receptor Coactivator* (SRC) Familie. Außerdem bindet AF-2 die FQNLF (AS 23-27) und WHTLF Motive für die intra- bzw. intermolekulare N-C-terminale (N-C)-Interaktion, welche für eine optimale Transaktivierung nötig ist (Duff *et al.*, 2006; Heery *et al.*, 1997).

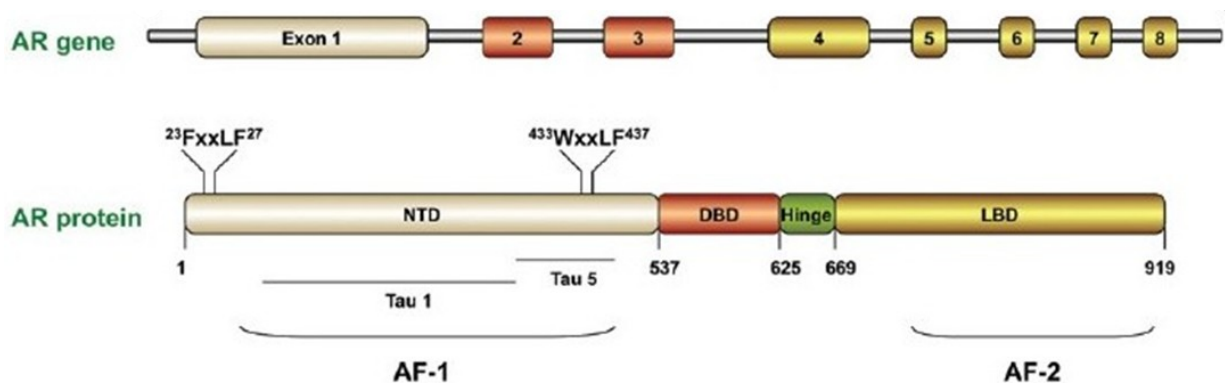


Abb. 2.1) Struktur des AR-Gens und -Proteins

Schematische Darstellung des AR-Gens, bestehend aus acht Exons, und der entsprechenden funktionellen Domänen des AR-Proteins unter Angabe der AS Position. Des Weiteren sind die Aktivierungsfunktionen (AF)-1, einschließlich der *Transcriptional Activation Units* (TAU)-1 und -5, sowie AF-2 gezeigt. Lonergan und Tindall (2011).

In Abwesenheit von AR-Liganden befindet sich der AR im Cytoplasma, assoziiert an Hitzeschockproteinen (HSP), welche den Rezeptor in einer inaktiven und gleichzeitig hochresponsiven Konformation halten und den AR außerdem vor Proteolyse schützen (Hessenkemper und Baniahmad, 2013; Edwards und Bartlett, 2005). Nach Diffusion in die Zellen wird Testosteron (T) durch die in der Prostata stark exprimierte 5-alpha-Reduktase zu Dihydrotestosteron (DHT) konvertiert. Die Bindung von Liganden an die AR-LBD induziert eine Konformationsänderung, wobei eine hydrophobe Tasche die Protein-Protein-Interaktionsfläche der AF-2 bildet. Diese rekrutiert bei den Steroidhormonrezeptoren die

LxxLL-haltigen CoA, vermittelt jedoch bei dem AR vorwiegend die intramolekulare Interaktion mit den entsprechenden N-terminalen Sequenzen (Lonergan und Tindall, 2011). Daraufhin folgt die Translokation in den Zellkern und der Wechsel zur DBD-abhängigen intermolekularen N-C-Interaktion, bevor die Bindung an *Androgen Response Elements* (ARE) innerhalb der regulatorischen Regionen von AR-Zielgenen erfolgt (van Royen *et al.*, 2012).

Die AR-Homodimerisierung könnte eine Rolle für die Translokation spielen, wobei die N-C-Interaktion vermutlich durch Bindung der DNA aufgelöst wird und dadurch CoA mit den entsprechenden Sequenzen interagieren können (Yuan *et al.*, 2013). Der transkriptionsaktivierende Komplex wird schließlich durch die sequenzielle Rekrutierung von CoA an die AF-Domänen der AR-NTD und LBD aufgebaut. CoA binden die DNA selbst nicht, sondern bewirken ein Chromatin *Remodelling* entweder intrinsisch oder durch Rekrutierung von Histonacetyltransferasen (HAT) wie *CREB (cAMP Response Element binding) binding Protein* (CBP), Histonmethyltransferasen oder der *Lysine specific Demethylase 1* (LSD 1), so dass der Transkriptionsinitiationskomplex binden kann (Lonergan und Tindall, 2011; Abb. 2.2).

Die normale Rolle der Androgene in der Prostata besteht in der Funktionssteuerung der luminalen Epithelzellen. Dementsprechend werden das als Diagnosemarker verwendete prostataspezifische Antigen (PSA) sowie Metabolismus-assoziierte Proteine vom AR transkriptionell aktiviert (Massie *et al.*, 2011). Interessant ist, dass, obwohl Androgene eindeutig das PCa-Wachstum induzieren, die meisten androgenresponsiven Zellzyklus-Gene jedoch nicht direkt durch den AR reguliert werden (Yuan *et al.*, 2013). Ein Mechanismus der Zellzyklusprogression durch den androgengebundenen AR ist die Transkriptions-unabhängige Aktivierung von mTOR und folglich eine Steigerung der Translation von D-Cyclinen sowie die Degradierung des Tumorsuppressors p27 (Yuan *et al.*, 2013; Balk und Knudsen *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2006). Die mTOR Aktivierung erfolgt vermutlich durch die nicht-genomischen Effekte des androgengebundenen AR im Cytoplasma, welche auch als *Rapid Signalling* bezeichnet werden. Dabei werden Signalkaskaden, wie z. B. Src (*Sarcoma Tyrosinkinase*), u. a. durch einen Zellmembran-assoziierten AR aktiviert (Pedram *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2007; Heinlein und Chang, 2002; Peterziel *et al.*, 1999). Dies führt zur Signaltransduktion über MAP Kinasen sowie PI3K, wodurch Akt phosphoryliert und schließlich mTOR aktiviert wird (Migliaccio *et al.*, 2000).

Ein direktes Zellzyklus-assoziiertes AR-Zielgen ist hingegen p21 (Lu *et al.*, 1999). Da p21 je nach Zellkontext und insbesondere in androgenunabhängigen PCa-Zellen durch Verstärkung

der Cyclin D - CDK 4 Assemblierung den Zellzyklus stimuliert (Calderon *et al.*, 2012; Balk und Knudsen, 2008), könnte dies ein Mechanismus der durch Androgene geförderten Proliferation sein. Des Weiteren vermittelt auch der im Prostatastroma schwach exprimierte AR durch Expressionssteigerung von Wachstumsfaktoren einen indirekten pro-proliferativen Effekt auf die Prostata-Epithelzellen (Yuan *et al.*, 2013, Yan *et al.*, 1992).

Neben der sehr gut untersuchten AR-Funktion als Transkriptionsaktivator, führt der AR auch zur Genrepression, entweder indirekt durch Interaktion mit anderen TF oder unmittelbar durch Transrepression. Ein Beispiel für Ersteres ist die AR-Interaktion mit dem Spezifitätsprotein 1 (Sp1), wodurch u. a. die Expression des Proto-Onkogens *c-MET* unterdrückt wird (Verras *et al.*, 2007; Curtin *et al.*, 2001). Darüber hinaus hemmt der AR die Proliferations-involvierten TF c-JUN und SMAD3 (Grosse *et al.*, 2012).

Der androgengebundene AR fungiert hingegen als direkter Transkriptionsrepressor durch Rekrutierung von CoR wie z. B. des *Ligand dependent CoR* (LCoR) (Asim *et al.*, 2011). Wie CoA binden CoR selbst nicht die DNA. Sie führen direkt oder indirekt u. a. über Rekrutierung von HDAC (Histondeacetylasen) zur lokalen Chromatinkondensation. Neuste Studien beweisen auch, dass die mit dem AR assoziierte LSD 1, sowohl als CoA als auch CoR fungiert, wodurch der AR auch dessen eigene Genexpression negativ reguliert (Abb. 2.2; Cai *et al.*, 2011). Weiterhin reprimiert der AR die Genexpression der Telomerase-Untereinheit hTERT (Moehren *et al.*, 2008), des embryonalen Stammzellregulators Sox2 (Kregel *et al.*, 2013) und der zwei prostataspezifischen Enzyme der Androgensynthese (AKR1C3 und HSD17B6). Letztere stellen mit der AR-Repression ein negatives Feedback des ARs dar, um dessen Niveau sowie das der intrazellulären Androgene an die Fluktuationen des Androgenspiegels im Serum anzupassen (Yuan *et al.*, 2013). Auffällig ist, dass die AR-reprimierten Gene vor allem mit der Zellzyklusprogression assoziiert sind, was der normalen AR Rolle entspricht, die Differenzierung von Prostataepithelzellen und weniger deren Proliferation zu steuern.

Die CoR Alien, *Nuclear Receptor CoR* (NCoR) und *Silencing Mediator for Retinoid or Thyroid Receptors* (SMRT) interagieren mit der NTD des androgengebundenen AR (Abb. 2.2). Dabei wird jedoch der AR nur mäßig inhibiert (Moehren *et al.*, 2007; Yoon und Wong 2006; Hodgson *et al.*, 2005; Dotzlaw *et al.*, 2002). Währenddessen ist die verstärkte Rekrutierung dieser CoR ein wesentlicher Mechanismus bekannter AR-Antagonisten wie Cyproteronacetat (CPA), Hydroxyflutamid (OH-F) und Bicalutamid (Casodex), indem diese durch kompetitive Bindung der LBD eine andere Konformationsänderung als Agonisten bewirken (Yuan *et al.*,

2013; Moehren *et al.*, 2007; Abb. 2.2). Hingegen wirken der natürliche AR Antagonist Atrarsäure sowie MDV3100, ein Antagonist der zweiten Generation mit höherer AR Affinität, über die Hemmung der AR N-C-Interaktion sowie Chromatinbindung (Atrarsäure: Dissertation W. Hessenkemper 2013; Roell und Baniahmad, 2011; MDV3100: Tran *et al.*, 2009).

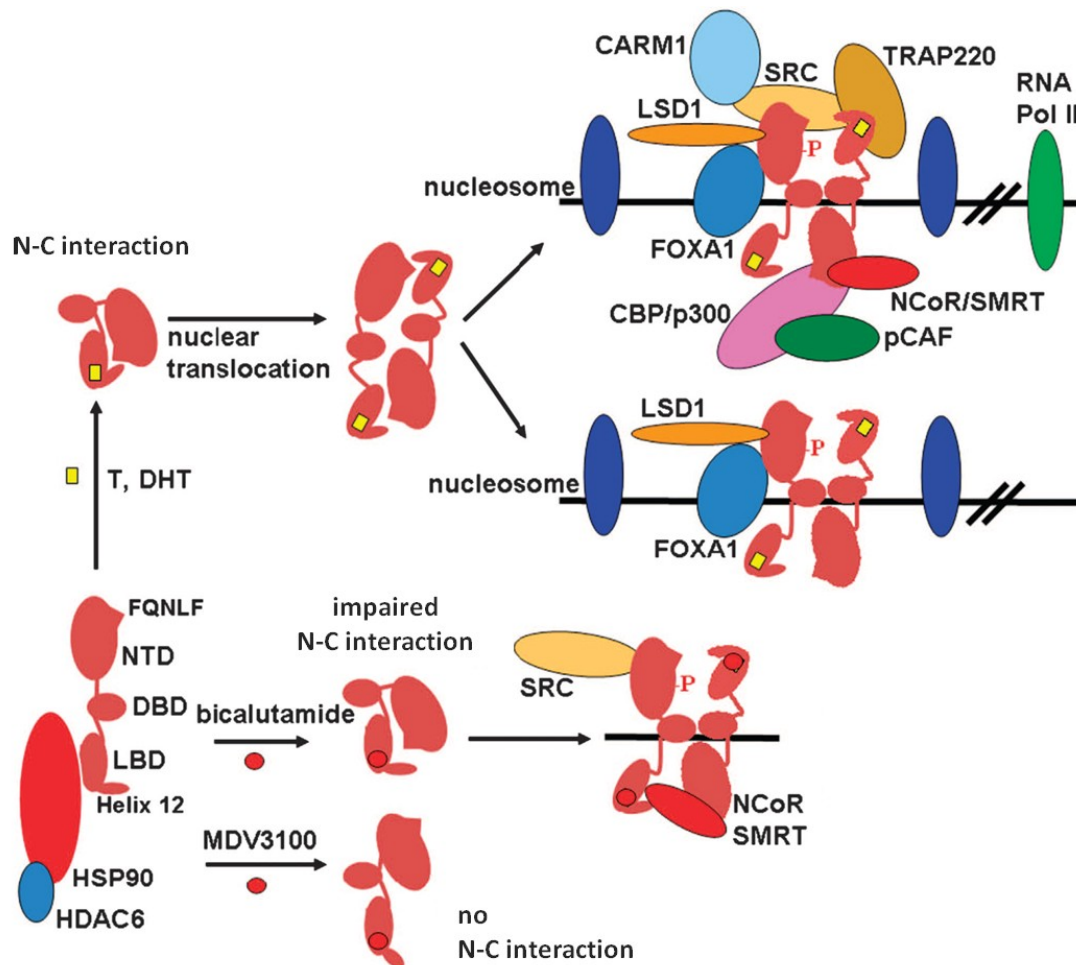


Abb. 2.2.) AR-Funktion nach Bindung von Androgenen sowie Antagonisten

Durch Bindung von Androgenen (T, DHT) an den zytosolischen, HSP-gebundenen AR wird eine Konformationsänderung der Helix 12 in der LBD vermittelt, wodurch diese die FQNLF Sequenz in der NTD bindet (N-C-Interaktion). Die anschließende Homodimerisierung trägt vermutlich zur AR-Translokation bei. Der AR bindet dann die ARE an Regionen, wo zuvor der allgemeine „Pionier“-TF FoxA1 das Chromatin lokal dekondensiert hat. Anschließend erfolgt die Assemblierung eines Komplexes aus CoA (SRC, TRAP220) und Chromatin-modifizierenden Enzymen (CBP/p300, PCAF, CARM 1, LSD 1), wodurch die RNA Polymerase (RNA Pol II) binden kann. Der Bicalutamid-gebundene AR bindet die ARE transients und rekrutiert anstelle von CoA vermehrt CoR (NCoR, SMRT). MDV3100 verringert die AR-Translokation und verhindert vermutlich aufgrund der gehemmten N-C-Interaktion die Chromatinbindung. Yuan *et al.* (2013).

2.2) Mechanismen der Prostatakrebs (PCa)-Progression

Das negative Feedback des ARs stellt eine Strategie zur Anpassung und Überwindung der ADT dar, indem das geringe Androgenniveau durch Erhöhung der AR-Expression sowie der intratumoralen Androgensynthese kompensiert wird (Yuan *et al.*, 2013). Schließlich spielen Veränderungen der dualen Funktion des ARs, als Transaktivator sowie Transrepressor, während der ADT eine entscheidende Rolle für die Progression zum CRPC. Anfangs werden die PCa-Zellen aufgrund der AR-vermittelten Steuerung des Metabolismus „ausgehungert“ und durch Inhibierung von mTOR in ihrem Wachstum gehemmt (Yuan *et al.*, 2013). Jedoch wird die zunächst unterdrückte AR-Aktivität durch De-Repression der AR-Expression sowie der intrakrinen Androgenproduktion ausgeglichen. Die zum Teil wiederhergestellte AR-Aktivität ist ausreichend für die Aufrechterhaltung der metabolischen Funktion, jedoch nicht für die Repression der AR negativ-regulierten pro-proliferativen Gene, so dass die PCa-Zellen schließlich kastrationsresistent wachsen (Abb. 2.3; Yuan *et al.*, 2013).

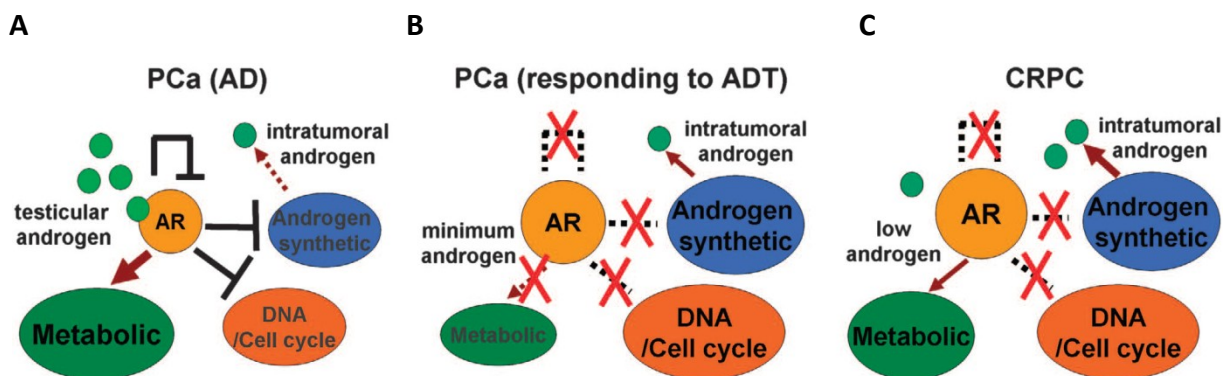


Abb. 2.3) Die De-Repression von AR-Zielgenen, welche mit dem Zellzyklus sowie der AR- und Androgensynthese assoziiert sind, führt zur Kastrationsresistenz infolge der Androgendepletion

A) In der Gegenwart testikulärer Androgenmengen wird in den androgenabhängigen (AD) PCa-Zellen das Wachstum durch den positiven Effekt auf metabolische Gene stimuliert, während die AR reprimierten DNA-Synthese- und Zellzyklus-assoziierten Gene durch die Aktivierung onkogener Signalwege überwogen werden. B) Die anfängliche Reaktion auf ADT ist die negative Regulation der metabolischen Gene, jedoch auch eine De-Repression der Gene für den AR, die Androgensynthese sowie für die DNA-Synthese und Proliferation. C) Bei der Progression zum CRPC tragen schließlich die erhöhte intratumorale Androgen- und AR-Synthese zur teilweise wiederhergestellten AR-Aktivität, einschließlich der metabolischen AR-Funktion, bei. Währenddessen reicht die AR-Aktivität nicht aus, gleichzeitig die normalerweise AR reprimierten Gene zu regulieren. Yuan *et al.* (2013).

In diesem Zusammenhang zeigten Cai *et al.* (2011) weiterhin, dass der AR in Abhängigkeit des Androgenspiegels und durch Assoziation mit LSD 1 entweder als Transaktivator, bei niedrigen Androgenmengen, oder Transrepressor bei hohen Mengen wirkt.

Dementsprechend wirken hohe Androgenkonzentrationen anti-proliferativ, u. a. durch die Induktion zellulärer Seneszenz (Dissertation J. Rödiger, 2012; Mirochnik *et al.*, 2012). Eine Wirksamkeit von Androgenzugaben bei PCa-Patienten ist allerdings unklar und aufgrund der Tumorheterogenität eingeschränkt (Yuan *et al.*, 2013). Somit bleibt die Suche nach neuen Strategien zur AR Inhibierung das primäre Ziel. Allerdings entwickeln sich wie bei den herkömmlichen Antagonisten auch bei denen der zweiten Generation Resistenzen, trotz effektiver Wirkung bei AR-Überexpression (Li *et al.*, 2013; Yuan *et al.*, 2013).

Für die Identifizierung neuer Angriffspunkte ist daher ein umfassendes Verständnis weiterer Mechanismen der Progression zu kastrationsresistentem Wachstum nötig. Neben der AR De-Repression des AR-Gens selbst sowie der Androgensynthese-Gene infolge der ADT (Abb. 2.3) sind in 30 % der untersuchten CRPC-Fälle AR-Genamplifikationen für die AR-Überexpression verantwortlich, wodurch u. a. Bicalutamid agonistisch wirkt (Waltering *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2004; Visakorpi *et al.*, 1995). Des Weiteren selektieren die ADT sowie AR-Antagonisten mit einer Häufigkeit von 10 % bis 30 % in CRPC für *gain of function* Punktmutationen in der AR-LBD, so dass die Ligandenspezifität verbreitert ist und somit andere Steroide und entsprechende Antagonisten den AR aktivieren (Waltering *et al.*, 2012; Hara *et al.*, 2003; Taplin *et al.*, 1999; Veldscholte *et al.*, 1992).

Ein weiterer neu entdeckter Mechanismus, um der AR Inhibierung durch die ADT sowie Antagonisten, welche beide auf die LBD abzielen, zu entgehen, ist die Expression von LBD-negativen und folglich konstitutiv-aktiven AR-Splicevarianten. Es sind ca. zwölf dieser ligandenunabhängigen AR-Isoformen bekannt, welche durch alternatives Splicen und vorzeitigem Translationsstopp entstehen. Sie sind mit der Progression zu CRPC assoziiert (Li *et al.*, 2013, Hu *et al.*, 2012; Dehm und Tindall, 2011; Mostaghel *et al.*, 2011), indem sie u. a. ein anderes Set an Genen transaktivieren, welche vorrangig der Androgensynthese sowie Zellzyklusprogression dienen, während der f.l. AR metabolische Enzyme induziert (Hu *et al.*, 2012). Die zugrunde liegenden Mechanismen sind Veränderungen in der AR-Genstruktur (Li *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2010), wobei eine Beteiligung des ARs selbst denkbar ist, ähnlich der Fusion des onkogenen ERG mit dem androgenregulierten TMPRSS2 (Transmembranprotease, Serin 2)-Promotor. Diese Fusion tritt bereits in Krebsvorstadien auf, wodurch sie offensichtlich ein initiirender Faktor der Tumorgenese ist (Nyquist und Dehm, 2013). Neben den Umstrukturierungen des AR-Gens kann auch alternatives Splicen der AR mRNA akut nach Androgendepletion induziert werden, was reversibel ist (Watson *et*

al., 2010). Diese Studien lassen außerdem eine Abhängigkeit der AR Splicevarianten vom f.l. AR vermuten, während andere Hinweise geben, dass das AR Isoform-vermittelte PCa-Wachstum nicht den f.l. AR benötigt (Li *et al.*, 2013; Barbieri *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2012). Die LBD-Deletionen sind ligandenunabhängig konstitutiv im Zellkern lokalisiert aufgrund des zusätzlich zur NLS fehlenden *Nuclear Export Signals* (Chan *et al.*, 2012). Neben diesen transaktivierenden AR-Splicevarianten existiert auch eine LBD- sowie DBD-negative membrangebundene Isoform (AR8) in CRPC Zellen, welche die Assoziation von Src, f.l. AR, *Estrogen Receptor* (ER) und dem *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) bei EGF Behandlung erhöht. Infolge dessen wird der f.l. AR durch Src phosphoryliert (Y534) und somit dessen Transaktivierungsfunktion gesteigert, wodurch AR8 zur Androgen-unabhängigkeit beiträgt (Yang *et al.*, 2011).

Generell zählt diese AR Aktivierung sowie Stabilisierung durch Src, welche in CRPC stärker aktiv ist (Xu *et al.*, 2012), zu den weiteren Mechanismen einer ligandenunabhängigen AR Reaktivierung (Dai *et al.*, 2010; Chang *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2006). In ähnlicher Weise sind auch andere Signalkaskaden, welche im Verlauf der PCa-Progression gesteigert sind, beteiligt, wie z. B. die Rezeptor-Tyrosinkinasen der *Insulin-like*-, Keratinozyten- und epidermalen Wachstumsfaktoren. Diese können den AR oder dessen CoA, wie z. B. SRC 1, durch Phosphorylierung aktivieren (Karantanos *et al.*, 2013; McCall *et al.*, 2008; Taplin, 2007). Somit wird deutlich, dass CRPC-Zellen Überlebensmechanismen entwickelt haben, indem sie Androgenmangel sowie AR Inhibierung durch verstärkte Wechselwirkung zwischen dem AR und den autokrinen bzw. parakrinen Signalwegen kompensieren.

In diesem Zusammenhang wurde auch gezeigt, dass die in androgenunabhängigen PCa-Zellen vermehrt aktiven MAP Kinasen sowie die Proteinkinase A (PKA) zu einer verminderten Interaktion zwischen AR und SMRT führen (Dotzlaw *et al.*, 2002; Eisold *et al.*, 2009). Darüber hinaus bewirken MAP Kinasen ein Dissoziieren der für die Assemblierung eines Repressorkomplexes nötigen SMRT-Dimerisierung (Varlakhanova *et al.*, 2011). Neben dieser Inaktivierung besteht außerdem aufgrund der AR-Überexpression ein relatives Defizit an CoR, welches zusätzlich durch die Hochregulation bzw. Aktivierung von CoA verursacht wird (Waltering *et al.*, 2012; Chmelar *et al.*, 2007). So führt Bicalutamid zur schwächeren Rekrutierung von NCoR in PCa-Zellen mit vermehrtem AR-Protein (Chen *et al.*, 2004), während die Überexpression von SRC2 und SRC3 mit dem Auftreten von Rezidiven korreliert (Xu *et al.*, 2009; Gregory *et al.*, 2001). Des Weiteren tragen die Expressionsminderung der

CoR SMRT und NCoR sowie EBP 1 (*ErbB3 Binding Protein 1*) zum kastrationsresistenten PCa-Wachstum bei (Godoy *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2008). Dementsprechend stellt der Verlust an funktionellen AR-CoR einen wesentlichen Mechanismus der Progression zum CRPC und folglich einen bedeutenden Ansatz für neue Strategien zur konstanten AR Inhibierung, unabhängig vom Expressionsstatus des ARs sowie dessen Coregulatoren dar. In dieser Arbeit sollten daher zellpermeable AR-spezifische Corepressorpeptide entwickelt werden, welche den endogenen Mangel ausgleichen bzw. vorbeugen und so den Erfolg der Therapie mit Antagonisten trotz vermehrter Aktivierung von Signalkaskaden, des ARs sowie der CoA verlängern könnten. Darüber hinaus wäre die gleichzeitige Hemmung der konstitutiv-aktiven LBD-negativen AR-Splicevarianten ein bedeutender Fortschritt bei bereits bestehendem CRPC. Noch aussichtsreicher sind jedoch CoR, welche den AR in Gegenwart von Androgenen inhibieren, wie z. B. LCoR (Asim *et al.*, 2011), wodurch die ADT und Antagonisten überflüssig wären und entsprechende Resistenzen verhindert bzw. überwunden werden könnten.

2.3) Der ligandenabhängige Corepressor LCoR als Grundlage neuartiger CoR

LCoR wird in nahezu allen fetalen und adulten Geweben exprimiert. LCoR bindet anhand des LxxLL Motivs die LBD der KHR und hemmt deren Transaktivierung durch Rekrutierung der coreprimierenden C-terminal-bindende Proteine (CtBP) sowie HDAC 3 und 6 (Palijan *et al.*, 2009a; b; Fernandes *et al.*, 2003). Darüber hinaus ist LCoR auch mit LSD 1 assoziiert (Shi *et al.*, 2003) und fungiert außerdem als CoR des TF *Krüppel Like Factor 6* (KLF 6, Calderon *et al.*, 2012). LCoR interagiert im Gegensatz zu den anderen KHR unabhängig vom LxxLL Motiv mit der DBD des ARs (Asim *et al.*, 2011), wodurch es hinsichtlich der LBD-negativen AR-Isoformen sehr vielversprechend für eine umfassende AR Inhibierung wäre. Aufgrund der LCoR Verbreitung und vielfältigen Interaktion mit TF sind eingegrenzte AR-spezifisch bindende LCoR Domänen, für welche Asim *et al.* (2011) Hinweise lieferten, als Basis neuartiger CoR sinnvoll. An diese sollte die Fusion einer Transrepressionsdomäne, z. B. SUMO (*Small Ubiquitin Like Modifier*) erfolgen.

SUMO wird an Lysine mit entsprechender Erkennungssequenz im Protein kovalent gebunden, was verschiedene Konsequenzen auf die Proteindegradierung und -Lokalisierung haben kann (Hay, 2005). Es besitzt jedoch ein starkes Potenzial zur transkriptionellen Repression, unabhängig von der SUMOylierungsfunktion (Reeb und Gerlach *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2003). Als Mechanismen der Transrepression werden, neben der Verdrängung

von CoA, die Rekrutierung von CoR, verbunden mit Histon-Deacetylierung und -(De-)Methylierung sowie anderen Chromatin-modifizierenden Komplexen, diskutiert (Treuter und Venteclef, 2011). Des Weiteren wirkt SUMO Protein-stabilisierend und ist nicht zytotoxisch (Roisin *et al.*, 2004). Insofern ist die SUMOylieringsmutante SUMO_{G97A} (Kamitani *et al.*, 1997), auch aufgrund der geringen Größe von nur 101 AS, sehr geeignet für die Generierung zellpermeabler CoR-Peptide.

2.4) Peptidaptamer-basierte CoR

Eine andere Quelle spezifisch AR-bindender Domänen für die Fusion an SUMO_{G97A} sind Peptidaptamere (PA). Sie stellen eine neue Klasse von Molekülen dar mit dem Potenzial, andere Proteine bzw. Domänen mit hoher Affinität und Spezifität zu binden und somit zu inhibieren (Buerger und Groner, 2003; Hoppe-Seyler und Butz, 2000). PA sind kurze (ca. 20 AS große), randomisierte Peptide (Hoppe-Seyler und Butz, 2000), die aus hochkomplexen Bibliotheken meist anhand von Hefe-zwei-Hybridsystemen isoliert werden. Sie werden in inerte Proteine mit stabiler Konformation, das heißt Gerüstproteine wie z. B. in das aktive Zentrum des bakteriellen Thioredoxin A (TrxA, ca. 12 kDa), integriert. So können die kurzen Oligopeptide konstant in einer bestimmten Konformation gehalten und auf der Außenseite exponiert werden (Hoppe-Seyler und Butz, 2000; Colas *et al.*, 1996; Ladner, 1995). Durch diese starre Struktur wird die Bindungsaffinität und Spezifität zum Zielmolekül verstärkt, da die Flexibilität des Peptids in Lösung, die Entropie, vor der Bindung minimiert wird (Mascini *et al.*, 2012; Seigneure *et al.*, 2011; Ladner *et al.*, 2004).

Durch ihre Eigenschaft, individuelle Domänen eines pleiotropen Proteins zu binden und somit gezielt bestimmte enzymatische Aktivitäten zu hemmen, können PA nicht nur für die Aufdeckung molekularer Mechanismen, sondern auch für eine neuartige Klasse diagnostischer und therapeutischer Strategien verwendet werden (Buerger und Groner, 2003; Hoppe-Seyler und Butz, 2000). Demnach sind PA funktionell vergleichbar mit Antikörpern, insbesondere monoklonalen Antikörpern, welche jedoch aufgrund ihrer Größe (ca. 150 kDa) und Komplexität durch vielfältige Glykolisierungen weniger für intrazelluläre Ziele geeignet sind und aufwendiger hergestellt werden müssen. Tatsächlich haben PA Dissoziationskonstanten, die ähnlich oder sogar besser sind (Crawford *et al.*, 2003). Sie sind weiterhin durch ihre geringe Größe (10-20 kDa) sowie Immunogenität, höhere Stabilität, Löslichkeit und Proteinfaltungskinetik vielversprechende Moleküle. Insofern finden PA

zunehmende Anwendungen als Inhibitoren für onkogene Angriffsziele (Liu *et al.*, 2013a; Mascini *et al.*, 2012; Seigneuric *et al.*, 2011). So zeigen präklinische Studien erfolgreiche Inhibierungen von CDK2 (Colas *et al.*, 1996), HPV E6 Onkoprotein (Butz *et al.*, 2000), EGFR (Buerger *et al.*, 2003), STAT 5 und 3 (Weber *et al.*, 2013; Nagel-Wolfrum *et al.*, 2004), ErbB2 (Kunz *et al.*, 2006), mutiertem p53 (Guida *et al.*, 2008), *Inhibitor of DNA binding Protein 1 and 3* (ID 1 und 3, Mern *et al.*, 2010), *Bcl-2-related Protein A1* (Bfl 1, Brien *et al.*, 2011) sowie HSP70 und 27 (Rérole *et al.*, 2011; Gibert *et al.*, 2011). Außerdem ist die relativ geringe Oberfläche des Gerüstproteins ein Vorteil, verglichen zu Antikörpern hinsichtlich der Minimierung von Nebeneffekten (Mascini *et al.*, 2012). Tatsächlich ist die Spezifität des CDK2-interagierenden PA so hoch, dass ausschließlich die Punktmutante und nicht das Wildtypprotein gebunden wird (Colas *et al.*, 1996), während ein anderes PA zwischen aktiven und inaktiven Ras unterscheiden kann (Xu *et al.*, 2002).

Auch gegenüber kleinen Substanzen (<500 Da), welche z. B. die ATP-Bindestelle von onkogenen Kinasen blockieren und somit viele Kinasen mit über 60 % AS-Übereinstimmung hemmen, liegen die Vorteile von PA in deren Spezifität (Seigneuric *et al.*, 2011). In dieser Hinsicht sind sie nachweislich auch der RNA Interferenz überlegen, da bestimmte Proteindomänen oder Konformationen und Modifikationen gebunden werden, ohne die gesamte Proteinfunktion zu hemmen (Liu *et al.*, 2013a; Gibert *et al.*, 2013; Gibert *et al.*, 2011). Es besteht außerdem ein Vorteil gegenüber DNA/RNA-Aptameren durch die Vielfalt funktioneller Gruppen, so dass neben der Spezifität, die Interaktion und somit Affinität zum Zielmolekül höher ist (Mascini *et al.*, 2012).

In Hinblick auf das Ziel einer spezifischen AR Inhibierung konnten in vorausgegangenen Arbeiten zwei AR-bindende PA (524 und 513) aus einer 2×10^8 großen Bibliothek, jeweils in TrxA integriert, isoliert werden. Nach Bestätigung der Interaktion in Säugerzellen konnte die Bindung nah verwandter KHR ausgeschlossen werden und es folgte die Fusion an SUMO_{G97A}. Die entstandenen neuartigen AR-CoR inhibierten nach Transfektion der kodierenden Plasmide effizient die AR-Transaktivierung sowie das Wachstum der androgenabhängigen LNCaP PCa-Zellen (Reeb und Gerlach *et al.*, 2011; Diplomarbeit I. Prade, 2008).

2.5) Generierung zellpermeabler Corepressorpeptide

Um die vielversprechenden neuartigen CoR anzuwenden, ist es von Vorteil, zellpermeable Peptide in die PCa-Zellen einzuschleusen zur Vermeidung von Risiken durch DNA Expressionsvektoren (Bohne und Cathomen, 2008). Eine solche Peptidtherapie stellt eine neue Strategie in der Krebsbehandlung dar (Shin *et al.*, 2014; Heitz *et al.*, 2009; Harada *et al.*, 2006; Buerger und Groner, 2003). Die Internalisierung von Peptiden in Zellen kann durch Liposomen-vermittelte Träger, was aufgrund von Toxizität und geringer Stabilität nachteilig ist (Seigneuric *et al.*, 2011), oder günstiger über Proteintransduktionsdomänen (PTD), wie zum Beispiel der HIV *Transactivator of Transcription* (TAT), realisiert werden. Diese können neben Proteinen auch DNA Plasmide, siRNA, Viruspartikel und Liposomen in Zellen transportieren (Wender *et al.*, 2000; Green und Löwenstein, 1988). Es wurden eine Reihe weiterer PTDs entdeckt bzw. konstruiert, darunter neun Arginine (9R). Dabei bestehen alle aus weniger als 30 AS und weisen Cluster von positiv geladenen AS auf, wodurch es zur elektrostatischen Interaktionen mit der negativ-geladenen Zelloberfläche kommt (Sakai *et al.*, 2005; Rothbard *et al.*, 2004). Allerdings ist der exakte Mechanismus der Internalisierung immer noch ungeklärt (Kanwar *et al.*, 2012). Das therapeutische Potenzial zellpermeabler Peptide wurde bereits vielfach anhand der effizienten Manipulation krankheitsassoziierter intrazellulärer Signalkaskaden nachgewiesen. So reduzierte ein TAT-konjugiertes Proteinkinase C (PKC)-Inhibitorpeptid die Stärke von Herzinfarkten in präklinischen Modellen (Inagaki *et al.*, 2003). Es wird in klinischen Studien der Phase II gegen Herzinfarkt und Schlaganfall untersucht (Heitz *et al.*, 2009). Des Weiteren konnte durch ein TAT-HSP70- sowie 9R-Survivin-Fusionsprotein ein neuroprotektiver Effekt (Baratchi *et al.*, 2011; Nagel *et al.*, 2008) erreicht werden. Währenddessen inhibieren folgende PTD-fusionierte Proteine das Wachstum von Tumoren *in vivo*: p53 (Snyder *et al.*, 2004), p21 (Bowne *et al.*, 2007) sowie ein *B-Cell Lymphoma 6* (BCL 6)-Inhibitorpeptid (Melnick *et al.*, 2007). Dominant-negatives Survivin konnte das Wachstum von PCa-Zellen hemmen (Cheung *et al.*, 2010).

An die PA-basierten AR-CoR wurde schließlich die synthetische PTD 9R fusioniert (Reeb und Gerlach *et al.*, 2011), da diese eine 20-fach höhere Effizienz gegenüber der natürlichen PTD TAT zeigte, einen Fluorophor in Zellen zu transportieren (Wender *et al.*, 2000). Der sogenannte zellpermeable Peptidaptamer-basierte Corepressor (PAB-CoR) 9R-524 konnte in LNCaP-Zellen transportiert werden und inhibierte die PSA-Expression sowie die Zellproliferation, wobei ein zytotoxischer Effekt ausgeschlossen wurde (Reeb und Gerlach *et*

al., 2011). Die effektivste PSA Reduktion besteht in Gegenwart des AR-Antagonisten OH-F, welcher ansonsten die in LNCaP-Zellen vorkommende AR-T877A-Mutante aktiviert (Veldscholte *et al.*, 1992). Möglicherweise ist eine ausreichende CoR-Verfügbarkeit durch ektopisches 9R-524 vorhanden, so dass OH-F wieder als Antagonist fungiert. Somit könnte 9R-524 einen wesentlichen Mechanismus der PCa-Progression unterdrücken. Auch 9R-513, bei welchem im Gegensatz zu 9R-524 das potenziell immunogene TrxA ohne Funktionsverlust entfernt werden konnte, zeigt eine vielversprechende LNCaP Wachstumsinhibierung (Diplomarbeit M. Heimann, 2010).

2.6) Zielsetzung

Die bisherige PCa-Therapie, einschließlich neuer AR-Antagonisten, führt oft zu Resistenzen und erneutem sowie aggressiveren Tumorwachstum, welches durch die Reaktivierung des ARs bedingt ist. Dieser spielt somit wie in den anfänglichen androgenabhängigen Stadien eine entscheidende Rolle und bleibt daher das primäre Ziel der Therapie. Dementsprechend sind neue Strategien zur AR Inhibierung erforderlich, um bestehende Resistenzen zu überwinden und alternierend auf verschiedene molekulare Mechanismen der AR Inhibierung zurückzugreifen. Eine wesentliche Ursache der Resistenz bisheriger Therapien ist eine Überaktivität des ARs durch Mangel an CoR. Das Problem natürlicher CoR ist jedoch die unspezifische, das heißt auch andere KHR betreffende Inhibierung. Deshalb ist der Ansatz dieser Arbeit, neuartige AR-spezifische CoR zu generieren und in die PCa-Zellen zu transportieren. Diese CoR sollten daher eine AR-Bindedomäne und eine Repressionsdomäne besitzen, welche den AR hemmt.

Zu diesem Zweck sollten zuerst humane und dann synthetische, spezifisch AR-bindende Peptide als Grundlage neuer AR-CoR, welche durch Fusion einer Transrepressionsdomäne entstehen, untersucht werden. In diesem Zusammenhang sollte die Behandlung von PCa-Zellen mit zellpermeablen CoR-Peptiden als neue Strategie analysiert werden.

Für das erste Konzept sollte humanes LCoR aufgrund der AR-Interaktion in Gegenwart von Androgenen (Asim *et al.*, 2011) untersucht werden, was entgegen der zumeist hormonsensitiven CoR potenziell eine Behandlung ohne ADT sowie Antagonisten ermöglicht. Ferner sind die natürliche und somit nicht immunogene AS-Sequenz sowie die unterschiedliche Bindung der AR-Region gegenüber anderen KHR-Regionen ein entscheidender Vorteil für die Generierung AR-spezifischer CoR. Nach der Bestätigung von

LCoR-Bindedomänen sollte zunächst die Eignung zur stabilen AR-Targetierung geprüft werden. Da die mit CRPC-assoziierte Src-Kinase zur Steigerung der AR-Transaktivierung in C4-2-Zellen führt und deren Invasion fördert (Asim *et al.*, 2008), sollten die LCoR-AR-Interaktion, die LCoR-Repression sowie -Proteinmenge unter Einfluss von Src in C4-2- und den nah verwandten androgenabhängigen LNCaP-Zellen analysiert werden.

Im zweiten Ansatz dieser Arbeit sollten die PA-basierten CoR, welche auf vollständig neuen und kurzen sowie hochspezifischen und –affinen AR-Interaktionsmotiven beruhen, untersucht werden. Für die Charakterisierung in den verschiedenen PCa-Zelllinien und die Aufklärung der molekularen Mechanismen sollten zunächst die rekombinante Expression und anschließende Affinitätsaufreinigung optimiert werden. Im Weiteren sollte neben der AR-Interaktion in Gegenwart verschiedener Liganden das AR-Repressionspotenzial der PAB-CoR-Peptide, auch bezüglich einer Punktmutante und insbesondere der LBD-negativen AR-Variante, überprüft werden. Außerdem sollte der Effekt auf das Wachstum verschiedener PCa-Zelllinien untersucht werden. Dabei sollten Analysen zur Induktion eines Zellzyklusarrests, von Apoptose und zellulärer Seneszenz sowie Westernblot-Analysen zur Ermittlung des Einflusses auf AR-regulierte Proteine Aufschluss über die Funktionsweise der PAB-CoR Peptide geben.

3) Material und Methoden

3.1) Substanzen, Software, Plasmide, Antikörper

Wenn nicht anders angegeben, stammen die Substanzen aus Deutschland. Dihydrotestosterone (DHT), Hydroxyflutamide (OH-F) und Natriumbutyrat (NaBu) wurden von Sigma-Aldrich, Bicalutamid (Casodex) von Interpharma (Tschechische Republik) und Methyltrienolone (R1881) von Perkin Elmer (USA) verwendet. Die Substanzen wurden in Dimethylsulfoxide (DMSO) gelöst und mit 0,1 % in den Experimenten eingesetzt. Der Src-Inhibitor PP2 (4-amino-5-(4-chloophenyl)-7-(t-butyl)-Pyrazolo(3,4-d)pyrimidine) und Akt-Inhibitor (1L6-Hydroxymethyl-chiro-Inositol-2-(R)-2-O-methyl-3-O-octadecyl-sn-glycerocarbonat) stammen von Calbiochem. Kalbsthymus-DNA wurde von Sigma eingesetzt.

Zur relativen Quantifizierung von Coomassie- und Westernblot-Banden diente LabImage 1D (Kapelan Bio Imaging Solutions). Zur Erstellung der DNA- und AS-Sequenzen (s. 8.2) wurde der Clonemanager GENTle und für die Zellzyklusanalyse wurde Cylchred (Ormerod) verwendet. Mit dem Programm ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam>) wurden der theoretische Instabilitätswert, die Halbwertszeit sowie der isoelektrische Punkt berechnet.

Folgende Plasmide wurden zur Verfügung gestellt bzw. generiert: pMMTV-luc (Gast *et al.*, 1998), pARR3-TK-luc (R. J. Matusik, USA), p4xUAS-TK-luc (Tenbaum *et al.*, 2007), pCMV-lacZ (U. Deutsch), pSG5/-hAR (Gast *et al.*, 1998), pSG5-hAR-T877A/-LCoR (M. Asim), pSG5-AR-Deletionsmutanten sowie pRSV-PKA (Dotzlaw *et al.*, 2002), pCDNA3-ATG-Linker (J. Medenbach), pcDNA3-ATG-9R/-513/-524 (Diplomarbeit C. Gerlach, 2008). pAB-gal₉₄ (Baniahmad *et al.*, 1990), pAB-gal₉₄-LCoR (M. Asim), pLNCX-Src-Y527F/-K295R (S. Courtneidge, USA), pCEV-Ras-V12/-N17 (Goeman *et al.*, 2005). Als bakterielle Expressionsvektoren dienten folgende: pGST-Linker (Baniahmad *et al.*, 1998), pGST-AR-DBD (A. Jatzkowski), pSG5-LCoR (J. White, Kanada), pGST-9R/-524 (C. Gerlach), pGST-9R-513 (ohne Trx) (M. Heinßmann), pETM-His (G. Stier), pETM-His-TAT/-513/-524 (K. Schärlich).

Alle Antikörper wurden in einer Verdünnung mit TBS-Tween-Puffer (50 mM TRIS pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1 % Tween 20) angesetzt. Folgende Primärantikörper wurden von Abcam verwendet: muriner polyklonaler Anti-β-Aktin Antikörper (ab 6276, 1:10.000 verdünnt), polyklonaler Anti-pRb Antikörper aus Kaninchen (ab 6075, 1:1.000 verdünnt). Von *Cell Signaling* stammten: muriner monoklonaler Anti-p21 Antikörper (2946, 1:1.000 verdünnt), muriner monoklonaler Anti-Cyclin D1 Antikörper (2926, 1:2.000 verdünnt), polyklonaler

Anti-Phospho-pRb(Ser807/811) Antikörper aus Kaninchen (9308, 1:500 verdünnt). Der murine monoklonale Anti-AR Antikörper stammt von Biogenex (F39.4.1, 1:500 verdünnt). Muriner monoklonaler Anti-PSA Antikörper wurde von Dako (M0750, 1:1.000 verdünnt) und polyklonaler Anti-LCoR Antikörper aus Kaninchen von Santa Cruz Biotchnology (sc-133729, 1:200 verdünnt) verwendet. Sekundärantikörper stammen von Santa Cruz Biotechnology und sind *Horseradish Peroxidase* (HRP)-gekoppelt: Anti-Kaninchen Antikörper aus Rind (sc-2370, 1:10.000 verdünnt), Anti-Maus Antikörper aus Ziege (sc-2005, 1:10.000 verdünnt).

3.2) Zelllinien

CV1-Zellen (Jensen *et al.*, 1964) stammen von Nierenzellen der afrikanischen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*). Diese fibroblastenartigen Zellen exprimieren keine funktionellen KHR. Sie wurden in *Dulbecco's modified Eagle's Medium* (DMEM) mit 5 % FCS (Invitrogen, Hitze-inaktiviert), 25 mM Hepes (pH 7,5) und 1 % Pen/Strep kultiviert. LNCaP (Tet) Zellen stammen aus einer Lymphknoten-Metastase und sind das Modellsystem für hormonabhängig wachsenden PCa. Sie enthalten einen Tetrazyklin-kontrollierten Transkriptions-Aktivator (Protopopov *et al.*, 2002) und wurden in RPMI 1640 mit 10 % FCS (nicht Hitze-inaktiviert), 25 mM Hepes (pH 7,5), 1 % Pen/Strep und 1 % Natriumpyruvat kultiviert. C4-2-Zellen stammen von LNCaP-Xenografts aus kastrierten Mäusen, wachsen androgenunabhängig und fördern die Metastasierung (Wu *et al.*, 1994). C4-2-Zellen wurden in 66,4 % DMEM, 20 % F12, 10 % FCS (nicht Hitze-inaktiviert), 25 mM Hepes, 5 µg/ml Insulin, 5 µg/ml Apotransferin, 0,25 µg/ml Biotin, 25 µg/ml Adenin und 1 % Pen/Strep kultiviert (Thalmann *et al.*, 1994). Die AR-Mutation T877A, welche in LNCaP- und C4-2-Zellen vorkommt, führt zur AR Aktivierung durch Progesteron, Östradiol, CPA sowie durch den kompletten Antagonisten OH-F (Veldscholte *et al.*, 1992). PC3-Zellen wurden von Knochenmetastasen eines PCa-Patienten isoliert und exprimieren keinen AR (Kaighn *et al.*, 1979). Sie wurden in DMEM mit 10 % FCS (Hitze-inaktiviert), 25 mM Hepes und 1 % Pen/Strep kultiviert. Alle Zellen wurden bei 37°C in 5 %iger CO₂-Atmosphäre kultiviert.

3.3) Bakterielle Biosynthese rekombinanter Proteine

Nach Transformation (s. Diplomarbeit C. Gerlach, 2008) von *E. coli* HB101 für die Expression von Glutathion-S-Transferase-(GST)-Fusionen und BL21 für His-Fusionen (pETM-Vektor) wurden diese direkt, ohne Ausplattieren, in einer 4 ml Vorkultur mit Lauria Berani (LB)-

Medium (10 g Bactotrypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl auf 1 l) mit dreimaliger Selektion durch Antibiotika (0,1 µg/ml Ampicillin bzw. 0,04 µg/ml Kanamycin bei pETM) alle 3 h und dann über Nacht (üN) inkubiert. 200 – 700 µl der Vorkultur wurden in 200 – 700 ml vorgewärmtes Medium überführt und bis zu einer OD_{600nm} von 0,6 bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG; 0,1 – 0,2 mM) wurde die Expression induziert und unter den angegebenen Bedingungen fortgesetzt.

3.4) Extraktion und Affinitätsaufreinigung GST-fusionierter Proteine

Alle Schritte fanden unter nativen Bedingungen und bei 4°C statt. Der Zellaufschluss der pelletierten *E. coli* HB101 Bakterien (15 min, 4.000 rpm) aus 500 ml Kultur erfolgte durch Resuspendieren in 10 ml Lysozym-haltigem (4 mg/ml, frisch dazugegeben) NETN-Puffer (100 mM NaCl; 20 mM TRIS-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA; 0,5 % NP-40) mit dem Zusatz von Protease-Inhibitoren (1 Tablette je 10 ml, Roche) sowie durch dreimaliges Schockgefrieren in Flüssigstickstoff und anschließendem Auftauen bei 37°C. Unlösliche Bestandteile wurden durch zweimalige Zentrifugation (20 min, 15.000 rpm) entfernt und der Überstand (Proteinextrakt) mit Glycerin (7 % Endkonzentration) bei -80°C in Aliquots aufbewahrt.

Die Kopplung an Glutathion-Sepharose 4B (GE Healthcare) fand nach Protokoll des Herstellers statt. Wenn nicht anders angegeben, wurden für präparative Ansätze 2 ml des Proteinextraktes mit 200 µl der 50 %igen äquilibrierten Sepharoselösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (Zentrifugation bei 500 g, 5 min) mit 1 ml NETN-Puffer folgte die Spaltung mit Thrombin über zwei weitere Waschschrte mit 1 ml STE-Puffer (150 mM NaCl; 10 mM TRIS pH 8,0; 1 mM EDTA) und schließlich dreimal mit 1,5 ml Waschpuffer (100 mM TRIS/HCL pH 8,0; 150 mM NaCl). Anschließend erfolgte die Umpufferung in den Spaltungspuffer (50 mM TRIS pH 7,5; 150 mM NaCl; 2,5 mM CaCl₂) oder PBS (130 mM NaCl; 7,7 mM Na₂HPO₄; 3 mM NaH₂PO₄; 2,7 mM KCl; 1,8 mM KH₂PO₄ pH 7,0) mit dem einfachen Volumen der Beads und die Spaltung durch Zugabe von 2,5 U Thrombin pro 100 µl pure Beads bei Rotation für 3 h bis üN. Der Überstand nach Zentrifugation beinhaltet die abgespalten Proteine, wobei diese mit dem Überstand einer zweiten 30 min Inkubation mit 0,2 µm filtriertem entionisierten Wasser (Millipore) vereinigt wurden. Die Proteinlösungen wurden, mit 7 % Glycerin, für die einmalige Nutzung aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

3.5) Extraktion und Affinitätsaufreinigung His-fusionierter Proteine

Nach Expression in *E. coli* BL21 Codon-(Arginin, Isoleucin, Prolin, Leucin)-Plus (Agilent Technologies) wurden die Proteine nach Angaben des Herstellers extrahiert und über Nickel-Nitrilotriacetat-(Ni-NTA)-Agarose (Invitrogen, s. Bachelorarbeit K. Schärlich, 2012) aufgereinigt. Die denaturierende Extraktion wurde modifiziert, indem zuerst 2 ml des Lysepuffers mit Lysozymzusatz (4 mg/ml, frisch dazugegeben) pro 100 ml Kultur für 5 min bei Raumtemperatur (RT) geschwenkt wurde und anschließend 6 ml Lysepuffer für weitere 10 min zugegeben wurde. Die hybriden Konditionen, das heißt denaturierende Extraktion, Affinitätsaufreinigung sowie erste Waschschrte und native letzte Waschschrte sowie Eluierung (bis zu viermal mit dem einfachen Volumen der puren Beads, rotierend für jeweils 30-60 min) stellten sich als geeignet heraus und wurden bei RT durchgeführt. Als Vergleich wurde für den Lysepuffer anstelle von 6 M Guanidin-Hydrochlorid 8 M Harnstoff verwendet. Der Gehalt von Imidazol (Merck) für die Eluierung wurde von 0,25 auf 0,75 bzw. 1 M erhöht. Zur Imidazolentfernung wurden die Eluate direkt anschließend in Zellosoeschläuchen mit einer Ausschlussgrenze von 14 kDa gegen das 20-fache Volumen mit PBS bzw. den verschiedenen Puffern unter langsamem Rühren bei 4°C dialysiert. Zum Äquilibrieren und Sterilisieren wurde der Dialyseschlauch zuvor in PBS aufgekocht. Innerhalb von ca. 36 h erfolgte dabei regelmäßig siebenmal ein Pufferwechsel, wobei DTT als Zusatz frisch dazu gegeben wurde. Die Quantifizierung der Proteinlösungen erfolgte mittels densitometrischer (Labimage) Bestimmung der entsprechenden Coomassiebanden über einen BSA Standard (s. Bachelorarbeit K. Schärlich, 2012). Die Proteinlösungen wurden mit Glycerin (7 % Endkonzentration) versetzt und in Aliquots für die einmalige Nutzung bei -80°C aufbewahrt.

3.6) GST-Pulldown

Dieses Verfahren weist Interaktionen zwischen Proteinen *in vitro* nach und beruht auf einer Immobilisierung von GST-Fusionsproteinen an Glutathion-Sepharose (Kaelin *et al.*, 1991). Zu diesem Zweck erfolgte die Aufreinigung über 20 µl Beads (s. Kapitel 3.3). Nach dreimaligem Waschen mit NETN-Puffer wurden zunächst unspezifische Bindestellen mittels 5 % fettfreiem Milchpulver in TBS-Tween (50 mM TRIS pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1 % Tween 20), welches zuvor 10 min gekocht und zentrifugiert (10 min, 4.000 rpm, 4°C) wurde, in einem Volumen von 200 µl für 1 h bei 4°C abgesättigt. Nach 2 h rotierender Inkubation bei 4°C mit 0,5 mg Ganzzellextrakt-Proteinen (s. Kapitel 3.6) in Gegenwart der entsprechenden

Hormone wurden die Beads fünfmal mit je 1 ml NETN-Puffer (mit 0,1 % NP-40 und Zusatz der Hormone) gewaschen (Zentrifugation 5 min, 2.200 rpm, 4°C). Gebundene Proteine wurden schließlich nach SDS-PAGE per Westernblot (s. Kapitel 3.7 und 3.8) detektiert, wobei die Ponceau-Färbung (0,1 % Ponceau S, 5 % Essigsäure) für 3 - 5 min und anschließendem Waschen in entionisiertem Wasser als Ladekontrolle der GST-Fusionsproteine diente. Für einen direkten Bindungsnachweis wurden anstelle des Ganzzellextraktes 2 - 10 µg isolierter His-Fusionsproteine (s. Kapitel 3.4) bei einem Imidazolgehalt von 20 mM verwendet.

3.7) Herstellung eukaryotischer Ganzzellextrakte und Proteinkonzentrationsbestimmung

Alle Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Zur Zellernte wurde das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen und in 1 ml PBS mit Hilfe eines Gummischabers geerntet. Nach Zentrifugation (5 min, 2.500 rpm) wurden die Zellen mit dem fünffachen Volumen NETN-Puffer (mit 0,1 % NP-40) für 10 min lysiert. Zum weiteren Aufschluss der Zellen erfolgte einmaliges Einfrieren bzw. Auftauen der Zellextrakte bei -20°C oder dreimaliges Frieren/Tauen in Flüssigstickstoff bzw. im Wasserbad bei 37°C. Anschließend wurden die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation (15 min, 15.000 rpm) entfernt. Die Proteinkonzentration wurde entweder spektralphotometrisch bei 280 nm bestimmt oder spezifisch mittels des Detergenz-resistenten *Bicinchoninic Acid* (BCA) Assays (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben ermittelt.

3.8) SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Durch die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) lassen sich mittels des denaturierenden Natriumdodecylsulfat (SDS), was alle Eigenladungen der Proteine mit einer Negativladung überdeckt, Proteine nach ihrer Größe im elektrischen Feld im SDS-Laufpuffer (25 mM TRIS, 191 mM Glycin, 0,1 % SDS) auftrennen (Laemmli *et al.*, 1970). Das obenliegende Sammelgel fokussiert die Proteinprobe, bevor mit dem Wechsel zum Trenngel der pH-Sprung eine Auftrennung bewirkt. Dabei erfolgt je nach Polyacrylamid-Konzentration (s. Diplomarbeit C. Gerlach, 2008) eine optimale Auftrennung im jeweiligen Molekulargewichtsbereich. Die Proteinproben wurden zuvor mit 5-fach-SDS-Auftragspuffer supplementiert und 5 min gekocht. Die Elektrophorese wurde mit 80 V (Einlaufen der Proben in die Matrix) begonnen und dann bei bis zu 250 V weitergeführt.

3.9) Coomassie-Färbung

Zur Visualisierung von Proteinbanden wurde das SDS-Gel mit Coomassie *Brilliant Blue*-(CBB)-G250 (0,5 % (w/v) in 45 % Methanol und 10 % Essigsäure) mit einer Nachweisgrenze von 0,5 µg Protein pro Bande für 30 - 60 min gefärbt und der Hintergrund anschließend mit Entfärbelösung (45 %Methanol, 10 % Essigsäure) für mehrere Stunden entfärbt. Alternativ wurde die fünffach sensitivere Coomassiefärbung nach Wang *et al.* (2007) durchgeführt, wobei zunächst die Fixierung (10 % Essigsäure, 10 % Methanol, 40 % Ethanol) für 1 h und Sensibilisierung (1 % Essigsäure, 10 % (w/v) Ammoniumsulfat) für 2 h erfolgte. Dann wurde das Gel in Färbelösung (5 % Essigsäure, 45 % Ethanol, 0,125 % (w/v) CBB-R250) für mindestens 4 h bzw. üN gefärbt. Es erfolgte eine einstündige Inkubation in Entfärbelösung I (5 % Essigsäure, 40 % Ethanol). Die vollständige Entfärbung des Hintergrundes wurde mit Entfärbelösung II (3 % Essigsäure, 30 % Ethanol) fortgesetzt. Die entfärbten Gele wurden schließlich für 30 min in Trocknungslösung gelegt (10 % Glycerin, 20 % Ethanol) und trockneten, zwischen Cellophanfolien gespannt (Roth), innerhalb von drei Tagen. Alle Inkubationsschritte erfolgten unter ständigem Schütteln und bei RT.

3.10) Westernblot-Analysen

Nach Auftrennung von Proteinlösungen (je 30 – 50 µg Protein) per SDS-PAGE erfolgte die Übertragung auf eine Membran (Renart *et al.*, 1979), in dieser Arbeit per *semi-dry* Elektrophoretische Übertragung auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF, Millipore) Membran, welche zuvor durch Inkubation mit Methanol für 60 sec aktiviert wurde. Der Blot (Aufbau: Anode, fünf Whatman-3MM-Papiere, aktivierte PVDF-Membran, SDS-Gel, fünf Whatman-3MM-Papiere, Kathode) wurde bei 125 mA und 60 min für eine Membran durchgeführt, wobei die Papiere und Membran vorher in Transferpuffer (SDS-Laufpuffer mit 20 % Methanol für Proteine <30 kDa und 10 % bei größeren Proteinen) getränkt wurden. Anschließend wurden unspezifische Bindestellen auf der Membran für 30 - 45 min bei RT mit einer fettfreien Milchlösung (5 % (w/v) in TBS-Tween) abgesättigt. Die Membran wurde im Folgenden mit in TBS-Tween verdünnten Primärantikörpern für 1 h bei RT bzw. üN bei 4°C bei Phosphospezifischen Antikörpern inkubiert. Nach drei Waschschritten (je 5 min mit TBS-Tween) wurde für 30 - 45min der Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper inkubiert. Die Membran wurde erneut dreimal gewaschen und dann die Nachweisreaktion mit der Substratlösung *ECL™ Detection Reagent* (Amersham) durchgeführt. Schließlich erfolgte die

Detektion, entweder mittels Röntgenfilmen oder digital (*ImageQuant LAS, GE Healthcare*). Bei nacheinander folgenden Untersuchungen wurde die Membran von den Antikörpern durch 5 – 10 min Inkubation mit Strip-Puffer (100 mM β -Mercaptoethanol, 2 % SDS, 62,5 mM TRIS/HCl pH 6,8) bei 56°C befreit. Die Quantifizierung erfolgte mit Labimage.

3.11) Reporterassays

Mithilfe der Calciumphosphat-Präzipitations-Methode wurden die eukaryotischen Zellen mit den Expressionsplasmiden transfiziert (Gerlach and Roell *et al.*, 2011), wobei für LNCaP-Zellen die Inkubationszeit von 16 - 18 h auf 48 h und die Luziferase (Luc)-Plasmidmengen zweifach auf 2 μ g per 6-Well erhöht wurden. 72 h nach entsprechender Hormonbehandlung in Medium mit Aktivkohle-behandeltem (Hormon-depletiertem) FCS erfolgten der Zellaufschluss mit 400 μ l Lysepuffer (50 mM TRIS-Acetat pH 7,8; 10 mM MgAc; 0,1 mM EDTA; 1 % Triton-X-100; 15 % Glycerin; 4 mM DTT; 0,2 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)) je 6-Well für 20 min bei RT und die Messung der Luziferaseaktivität mit 50 μ l des Lysats und 100 μ l Luziferin-CoenzymA-Lösung (50 mM TRIS-Acetat pH 7,8; 360 μ M Luciferin; 1 mM ATP; 400 μ M Coenzym A) für 10 sec im Luminometer. Die Normalisierung erfolgte durch cotransfizierte β -Galaktosidase (lacZ), deren Aktivität mittels Zugabe von 200 μ l Substrat O-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (ONPG) (4 mg/ml ONPG in 0,1 M KPO_4 -Puffer pH 7,0) zu 50 - 100 μ l Lysat ermittelt wurde. Das Volumen wurde bis 900 μ l mit Z-Puffer (60 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 40 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$; 10 mM KCl; 1 mM MgSO_4 ; 50 mM β -Mercaptoethanol, pH 7,0) aufgefüllt. Die Reaktion fand bei 37°C bis zur Gelbfärbung statt, wonach die LacZ Aktivität spektralphotometrisch bei 420 nm und der Formel: $\text{OD}_{420} \times 1000 / \text{min Inkubation}$ errechnet wurde.

3.12) Zytometrische Analyse des Zellzyklus

Zur Bestimmung der Zellzyklusphase wurden durchflusszytometrische Analysen (*Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS*) mittels Propidiumiodid (PI) durchgeführt. PI ist ein fluoreszierender Stoff, der in Nukleinsäuren interkaliert und den DNA-Gehalt der Zellen wiedergibt (Crissman *et al.*, 1979). Die Zellernte erfolgte durch einmaliges Waschen mit PBS und dem Ablösen durch 250 μ l Trypsin und anschließend 750 μ l Medium je 6-Well. Nach zweimaligen Waschen mit 1 ml PBS (Zentrifugation für 5 min, 2.500 rpm, RT) wurden die Zellen in 300 μ l kaltem PBS resuspendiert und durch 700 μ l kalten EtOH (99,8 %) unter

10 sec Vortexen und mindestens 3 h bei -20°C fixiert und permeabilisiert. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 2.500 rpm, 4°C) wurden die Zellen in 800 µl Färbelösung (50 µg/ml PI, 0,1 mg/ml RNase, 0,05 % Triton X-100) resuspendiert und für 45 min auf dem Rotator bei 4°C lichtgeschützt inkubiert. Pro Probe wurden 10.000 Zellen zytometrisch analysiert, wobei *Forward Scatter* (FSC, Zellgröße), *Sideward Scatter* (SSC, Zellgranularität), FL3 und FL3-A (Fluoreszenzdetektion im Bereich von PI) gemessen wurden. Die Daten wurden anschließend mittels des Programms Cylchred ausgewertet, wobei anhand von Algorithmen zur Zellzyklusanalyse (Ormerod *et al.*, 1987; Watson *et al.*, 1987) das Fluoreszenzhistogramm automatisch erstellt wird mit den prozentualen Anteile der Zellzyklusphasen (G1/G0, S, G2/M). Des Weiteren gibt die SubG1-Phase einen Hinweis auf apoptotische Zellen.

3.13) Apoptose-Analyse

Apoptotische Zellen können durch Annexin V, was sich während der frühen Apoptose auf der Zelloberfläche befindet und an Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) gekoppelt ist, sowie PI, welches nicht zelldurchlässig bei intakter Zellmembran ist und der Abgrenzung nekrotischer Zellen dient, per FACS-Analyse quantifiziert werden (Vermes *et al.*, 1995). Die Färbung und Messung erfolgte nach Herstellerangaben (AAT Bioquests), wobei die Zellen ohne vorherigen Waschschrift mit 250 µl Trypsin je 6-Well und 2 ml Medium vorsichtig geerntet und zweimal mit erst 2ml und dann 1 ml PBS + 2 % FCS gewaschen (5 min, 300 g) wurden. Es folgte die Zählung per Neubauerkammer. Von der Ernte bis zur Färbung mit jeweils 100.000 Zellen wurden alle Schritte bei 4°C durchgeführt.

3.14) Detektion zellulärer Seneszenz

Als Marker für zelluläre Seneszenz gilt die Aktivität der Seneszenz-assoziierten-(SA)-beta-Galactosidase bei einem pH von 6,0 (Dimri *et al.* 1995). Dazu wurden die in 12-Wellen behandelten Zellen mit 1 % Glutaraldehyd in PBS für 5 min fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit Substratlösung (1 mg/ml X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid), 40 mM Zitronensäure/Natriumphosphat-puffer (36,85 ml Zitronensäure; 63,15 ml Natriumphosphat pH 6,0), 5 mM K₃Fe(CN)₆; 5 mM K₄Fe(CN)₆; 150 mM NaCl; 2 mM MgCl₂) für 18 bis 72 h bei 37°C ohne CO₂ inkubiert. Die blaugefärbten Zellen wurden unter dem Mikroskop ausgezählt, wobei insgesamt zweimal 200 Zellen je 12-Well gezählt wurden.

4) Ergebnisse

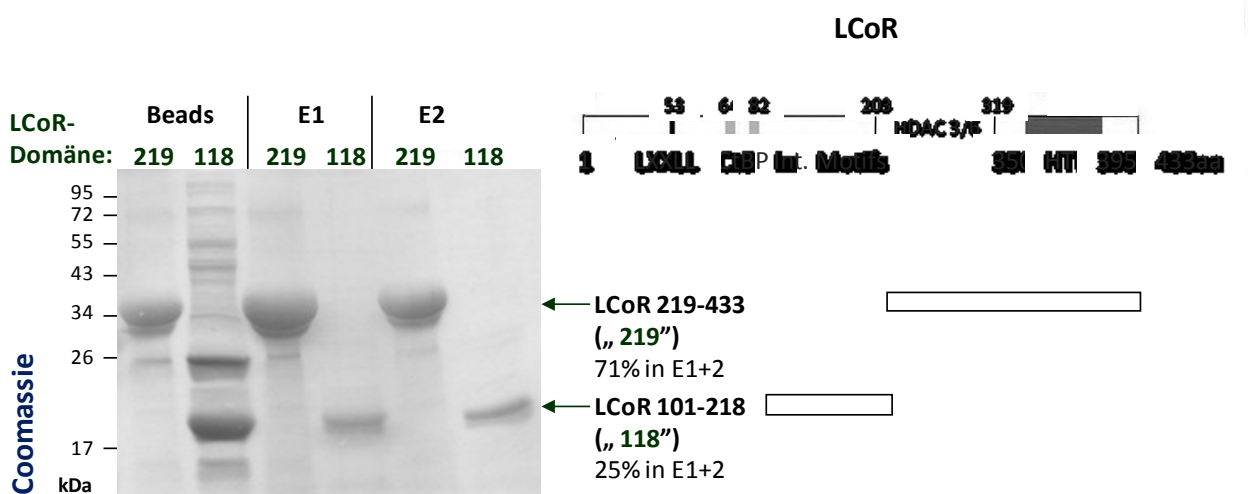
4.1) Einfluss von Androgenen und Src-Signaling auf die endogene Repressionsfunktion von LCoR und dessen Bindung an den AR

4.1.1) Bestätigung der direkten Interaktion zwischen AR-DBD und LCoR

Um den AR spezifisch zu hemmen, sollten neue CoR hergestellt werden. CoR enthalten eine spezifische Domäne zur Interaktion mit TF und eine Repressionsdomäne. Da LCoR den AR bindet, sollte die Interaktion mit dem AR genauer analysiert werden.

Für eine potenzielle Generierung neuer AR-Corepressorpeptide mit den LCoR-Domänen 101-218 sowie 219-433, bei welchen eine indirekte AR-DBD-Interaktion anhand von Reporterassays angedeutet wurde (Asim *et al.*, 2011), sollte hier die direkte Bindung an die AR-DBD nachgewiesen werden. Zu diesem Zweck wurde ein Pulldown der in *E.coli* exprimierten GST-AR-DBD durchgeführt und die ebenso exprimierten, über His-Fusion aufgereinigten LCoR-Domänen zugegeben. (Abb. 4.1). Nach Optimierung der Expressions- sowie Aufreinigungsbedingungen wies His-LCoR 219-433 eine gute Eluierungseffizienz (ca. 70 %) auf im Vergleich zu nur ca. 25 % bei His-LCoR 101-218 (Abb. 4.1A). Beide Domänen zeigen interessanterweise eine spezifische und voneinander unabhängige direkte Bindung an GST-AR-DBD (Abb. 4.1B).

A



B

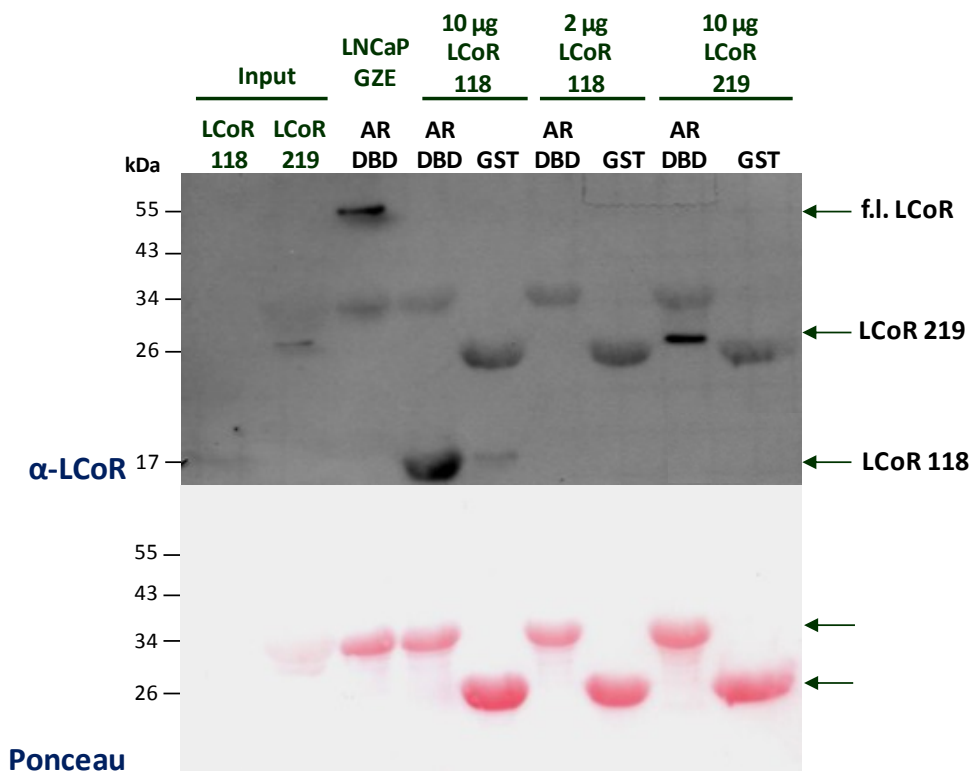


Abb. 4.1) Die LCoR-Domänen 101-218 und 219-433 binden direkt an die AR-DBD *in vitro*

A) Die Coomassiefärbung nach SDS-PAGE zeigt die affinitätsaufgereinigten His-fusionierten LCoR-Domänen 101-218, abgekürzt LCoR 118 (17 kDa), sowie 219-433, abgekürzt LCoR 219 (26 kDa), welche an Beads gebunden (nach Eluierung) bzw. im Eluat (E) gelöst sind. Die Aufreinigung von 160 μ l *E. coli* Extrakt mit 20 μ l NI NTA Agarose erfolgte unter Hybridkonditionen. Die Pfeile zeigen die Domänen an mit den darunter stehenden, densitometrisch bestimmten Eluierungseffizienzen (Anteil der Eluate an der Gesamtmenge aus Beads und Eluaten). Rechts ist ein Schema des LCoR-Proteins aus Calderon *et al.* (2012) gezeigt, ergänzt mit den Angaben in Palijan *et al.* (2009a).

B) Der Westernblot gegen LCoR (α -LCoR) erfolgte nach dem GST-Pulldown, wobei der *E. coli* Extrakt für GST (17 μ l) und GST-AR-DBD (150 μ l) über 20 μ l Glutathion-Beads aufgereinigt wurde. Diese wurden anschließend mit 5 % Milchpulver, gelöst in TBS-Tween abgesättigt, welches zuvor 10 min gekocht und zentrifugiert (10 min 4.000 rpm, 4°C) wurde. Die Beads wurden mit 2-10 μ g der photometrisch quantifizierten His-LCoR-Domänen bei einer Imidazol-Endkonzentration von 20 mM inkubiert. Diese Konzentration wurde als Maximum ermittelt (nicht gezeigt). 20 % Input und somit 2 μ g der His-LCoR-Peptide wurden geladen, während 0,5 mg LNCaP Ganzzelextrakt-Protein (GZE) als Positivkontrolle für die Bindung von f.l. LCoR diente. Die Ponceau-Färbung diente als Ladekontrolle.

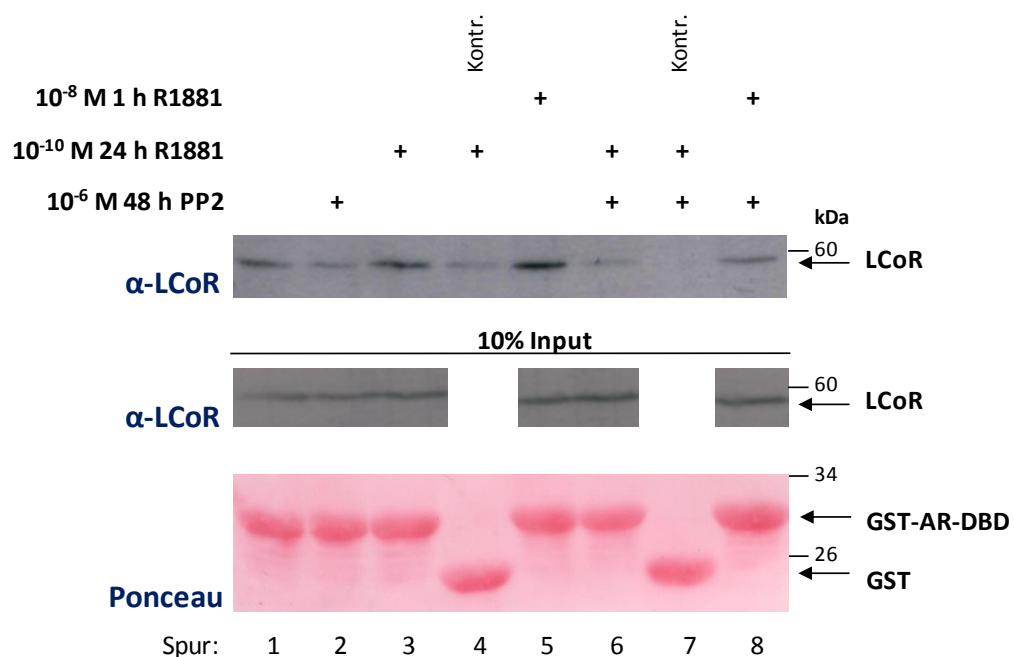
Demnach konnten für die AR-Bindung zwei Domänen für eine direkte Bindung an den AR identifiziert werden. Besonders dabei ist, dass beide LCoR-Proteindomänen außerhalb des LxxLL Motives liegen, welches für die Interaktion mit anderen KHR (Fernandes *et al.*, 2003) benötigt wird. Aus Asim *et al.* (2011) geht hervor, dass die LXXLL-haltige LCoR-Domäne 1-90 nicht mit dem AR interagiert. So besteht bei LCoR 101-218 und 219-433 eine AR-spezifische Bindung, was diese Domänen zu geeigneten Bestandteilen potenzieller, neuartiger und spezifischer AR-CoR macht.

4.1.2) *Src-Signaling* und Androgene beeinflussen die Interaktion zwischen LCoR und AR

Die Hemmung der LCoR-Bindung an den AR kann, ähnlich wie bei SMRT (Eisold *et al.*, 2009), ein möglicher Mechanismus für eine unkontrollierte, erhöhte AR-Aktivität, besonders in CRPC sein. Bevor die identifizierten LCoR-Interaktionsdomänen als Bestandteile neuer AR-CoR zum Einsatz kommen, sollte daher der Effekt der zentralen Signalkaskade über die Src-Kinase, welche in PCa überaktiviert ist und zu androgenunabhängigen Wachstum führt (Tatarov *et al.*, 2009), auf die Bindung von LCoR an die AR-DBD geprüft werden. Somit kann die Wirksamkeit potenzieller LCoR-basierter AR-CoR bei fortgeschrittenen Tumorstadien besser eingeschätzt werden. Aus den Arbeiten von Asim *et al.* (2008) geht hervor, dass die Src-Kinase in C4-2-Zellen überexprimiert ist und deren Invasivität fördert. Daher sollte untersucht werden, ob als möglicher Mechanismus die LCoR-Bindung an die AR-DBD betroffen ist. Dazu wurde diese Interaktion nach Behandlung der C4-2-Zellen mit dem Src-Inhibitor PP2 in An- oder Abwesenheit des synthetischen Androgens R1881, welches die LCoR-AR-Bindung stärkt (Asim *et al.*, 2011), analysiert.

Im Pulldown von GST-AR-DBD zeigte sich nach der Inkubation mit den C4-2-Ganzzellextrakten eine durch R1881-induzierte Interaktion mit LCoR, welche nach 1 h mit 10^{-8} M stärker ist als nach 24 h mit 10^{-10} M R1881 (Abb. 4.2A). PP2 hingegen bewirkt eine Inhibierung der Liganden-unabhängigen (vgl. Spur 1 und 2) als auch beider R1881-induzierten Interaktionen (vgl. Spur 3 und 6 bzw. 5 und 8).

A



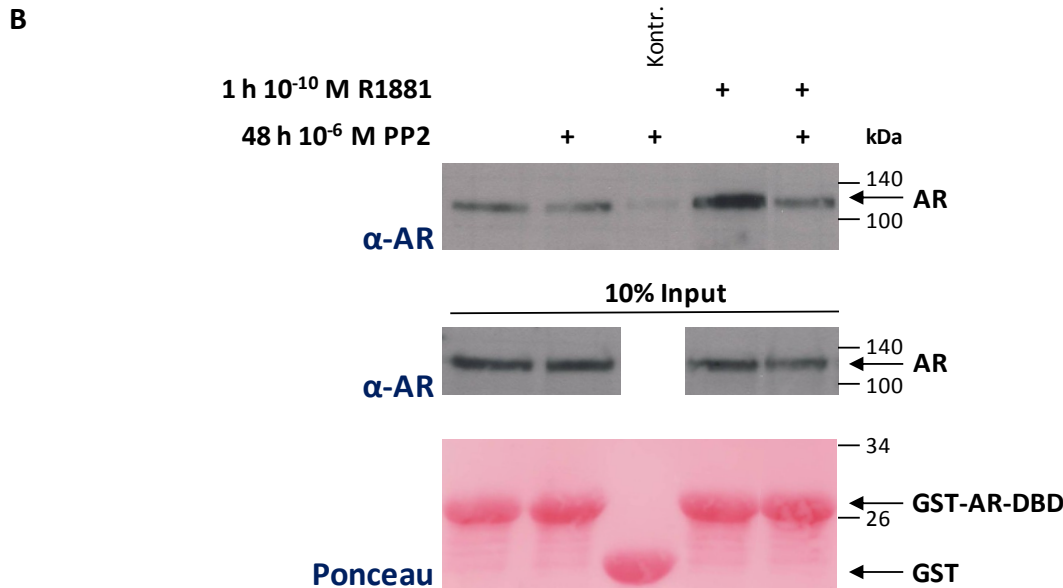


Abb. 4.2) Der Src-Inhibitor PP2 hemmt die Liganden-unabhängige sowie R1881-induzierte Interaktion der AR-DBD mit LCoR

Die Westernblots gegen LCoR (α -LCoR, A) sowie AR (α -AR, B, Spuren stammen vom selben SDS-Gel) erfolgten nach GST-Pulldown. Dazu wurde der *E. coli* Extrakt für GST (50 μ l) als Negativkontrolle (Kontr.) sowie GST-AR-DBD (150 μ l) mit jeweils 20 μ l Glutathion-Sepharose aufgereinigt und anschließend mit 0,5 mg Ganzzelextrakt-Protein der C4-2-Zellen inkubiert, welche 48 h mit 10^{-6} M PP2 bzw. R1881 10^{-8} M für 1 h (verwendet für die LCoR-Bindung an den PSA Promotor per ChIP, Asim *et al.*, 2011) oder 10^{-10} M für 24 h (verwendet für die PSA-Expression per qRT-PCR, Asim *et al.*, 2011) behandelt wurden. Vor der Zugabe der Ganzzelextrakte wurden die Beads wie zuvor mit 5 %igem Milchpulver (Abb. 4.1B) geblockt. Für die Inkubation mit GST-AR-DBD wurden jeweils 10 % Input und somit 50 μ g Protein der Ganzzelextrakte aufgetragen. Die Ponceau-Färbung diente als Ladekontrolle.

Ein ähnliches Bindungsverhalten an die AR-DBD zeigt auch der endogene AR aus den C4-2-Extrakten (Abb. 4.2B). Diese Interaktion spiegelt die DBD-abhängige AR-Homodimerisierung wider (van Royen *et al.*, 2012). PP2 hemmt diese, durch R1881 ($1 \text{ h } 10^{-8} \text{ M}$) -induzierte Interaktion. Demnach kann vermutet werden, dass Androgene sowie Src-Signaling die AR-Homodimerisierung sowie die LCoR-AR-Interaktion fördern. Dieser Effekt sollte funktionell anhand der LCoR-vermittelten Repression in Reporterassays weiter untersucht werden.

4.1.3) Src-Signaling und Androgene regulieren die LCoR-Repression

Zur Messung der LCoR-Repression wurde ein Reporterassay mit 4xUAS-TK-Luc (4x-*Upstream Activating Sequence-Thymidine Kinase-Luc*) als Reporter und der an UAS-bindenden Gal-DBD (Gal) bzw. dessen Fusion mit LCoR verwendet. Zuerst wurde die CaCl_2 -vermittelte Transfektion in C4-2-Zellen anhand von GFP-Studien optimiert. Durch Verdoppelung der Inkubationsdauer, den Verzicht der Medienzusätze (Biotin, Adenin,

Apotransferrin, Insulin) sowie Verwendung des HEBS-Puffers für größere Kristalle wurde die Transfektionseffizienz von 12 % auf 20 % erhöht. Das für LNCaP-Zellen spezialisierte Protokoll (Moehren *et al.*, 2008) führte hingegen nicht zur Steigerung.

In Reportergerassays wird schließlich nach zusätzlicher Erhöhung des Reportergeren-Plasmids eine sechsfach stärkere Effizienz erreicht (nicht gezeigt). Nach 72 h Behandlung der C4-2-Zellen mit R1881 (10^{-9} M) und PP2 (10^{-6} M) zeigt sich schließlich, dass die Src-Inhibierung die R1881-verstärkte LCoR-Repression wieder auf das Ausgangsniveau reduziert (Abb. 4.3A).

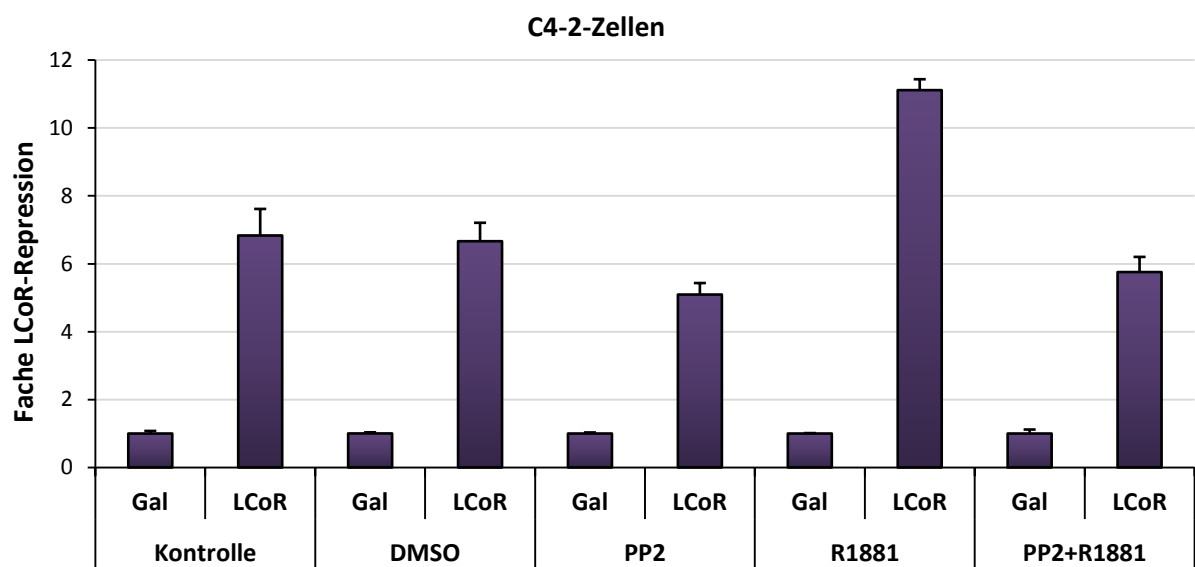
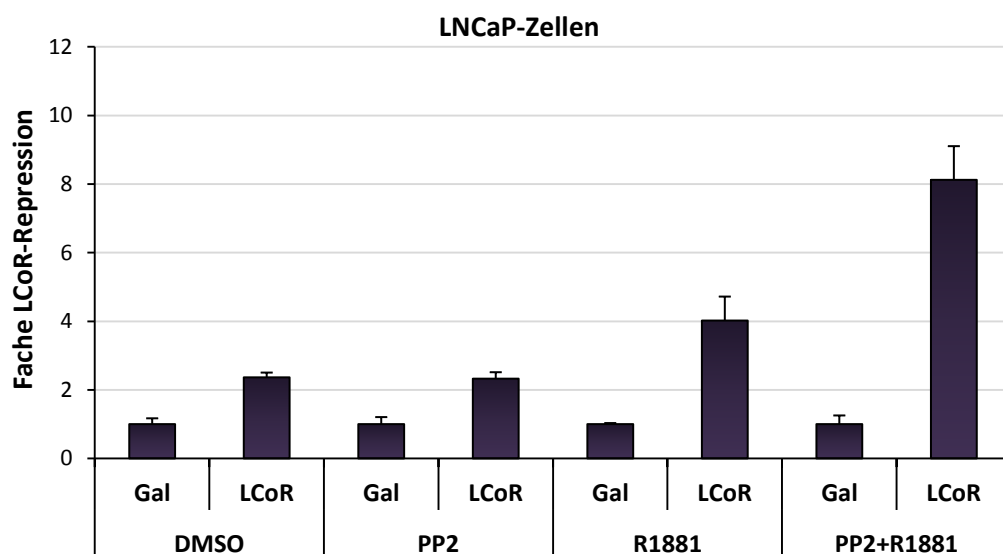
A**B**

Abb. 4.3) In C4-2-Zellen hemmt PP2 die R1881-verstärkte LCoR-Repression, in LNCaP-Zellen aktivieren beide Substanzen synergistisch

Die Reporterassays zur Messung der LCoR-Repression wurden in C4-2- (A) und LNCaP- (B) Zellen durchgeführt. Es wurden jeweils 300.000 Zellen in Hormon-depletiertem Medium in einem 6-Well ausgesät. 24 h später erfolgte die Transfektion mit 2 µg p4xUAS-TK-Luc, 2 µg pAB-Gal/Gal-LCoR sowie 0,2 µg pCMV-LacZ. C4-2-Zellen (A) wurden 48 h später mit PBS gewaschen, während für LNCaP-Zellen (B) das Protokoll nach Moehren *et al.* (2008) verwendet wurde. Die Behandlung erfolgte jeweils für 72 h mit 10^{-9} M R1881 bzw. 10^{-6} M PP2 oder beidem gleichzeitig in Hormon-depletiertem Medium. Gezeigt ist jeweils die fache LCoR-Repression, d. h. die mit der LacZ Aktivität normalisierten Luc-Werte, wobei Gal jeweils 1 gesetzt wurde. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung vom Mittelwert einer Zweifachbestimmung an.

Fünf- bzw. zehnfach höhere PP2 Konzentrationen haben ebenfalls keinen steigernden Effekt auf die LCoR-Repression (nicht gezeigt). Bei gleicher Behandlung in LNCaP-Zellen, welche weniger Src als C4-2-Zellen exprimieren (Asim *et al.* 2008), sind die Ergebnisse nach alleiniger PP2- sowie R1881-Behandlung ähnlich (Abb. 4.3B). Das Androgen fördert in beiden PCa-Zellen die LCoR-Repression, wobei in LNCaP-Zellen die Kombination mit PP2 entgegen der Wirkung in C4-2-Zellen zu einer synergistischen Verstärkung der LCoR-Repression führt. Androgenabhängige und -unabhängige Zellen zeigen dementsprechend ein unterschiedliches Verhalten hinsichtlich der PP2 Wirkung auf die LCoR-Repression. Der Effekt durch R1881 deutet auf eine verstärkte Interaktion zwischen LCoR und AR in beiden Zelllinien hin, welche in C4-2-Zellen nachweislich durch PP2 vermindert wird.

4.1.4) Identifizierung der an der LCoR-Repression beteiligten AR-Domänen in CV1-Zellen

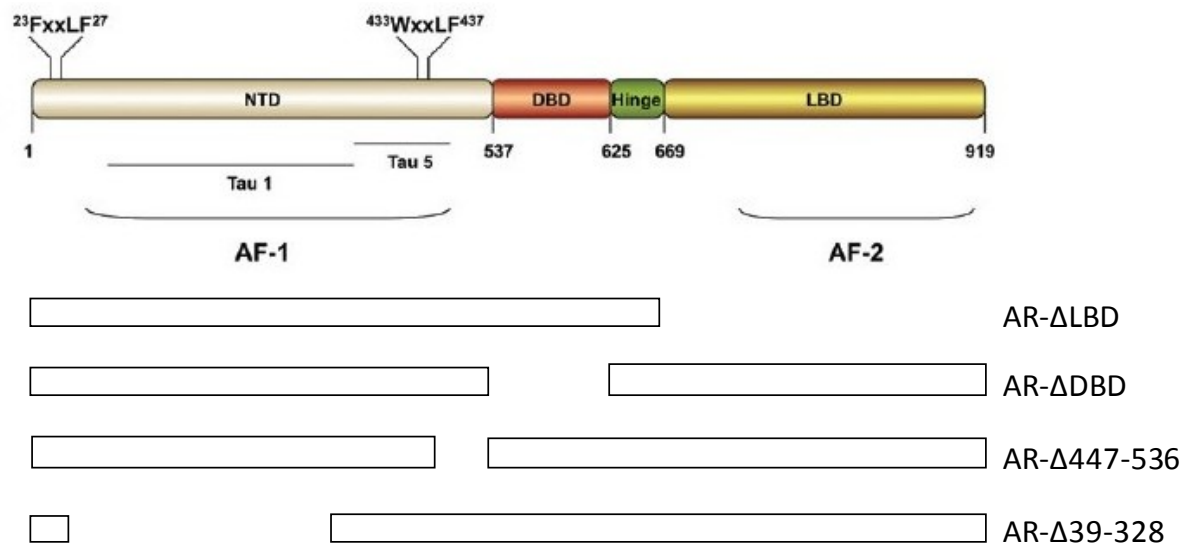
Aufgrund der in C4-2- sowie LNCaP-Zellen beobachteten LCoR-Funktionssteigerung durch R1881 sollte anhand von AR-Deletionsmutanten in CV1-Zellen untersucht werden, welche AR-Domäne verantwortlich dafür ist. Allerdings ist in diesen AR-negativen Zellen trotz der Transfektion verschiedener AR-Mengen (0,2 bis 3 µg je 6-Well) kein R1881-Effekt auf die LCoR-Repression nachweisbar (nicht gezeigt).

In CV1-Zellen ist interessanterweise die LCoR-Repression wesentlich stärker als in den untersuchten PCa-Zellen (Abb. 4.4B), was zuvor auch für die CoR Alien und NCoR beobachtet wurde (Dissertation M. Asim, 2008). Die LCoR-Repression scheint in CV1-Zellen AR-unabhängig zu sein, da diese ähnlich stark auch ohne AR Cotransfektion vorhanden ist (nicht gezeigt). PP2 reduziert somit im Gegensatz zu den PCa-Zellen bereits in der Abwesenheit von Androgenen die LCoR-Repression (Abb. 4.4B). Sie wird jedoch offensichtlich nicht durch die Akt Kinase beeinflusst, über welche als *downstream target* der Src-Kinase die R1881-

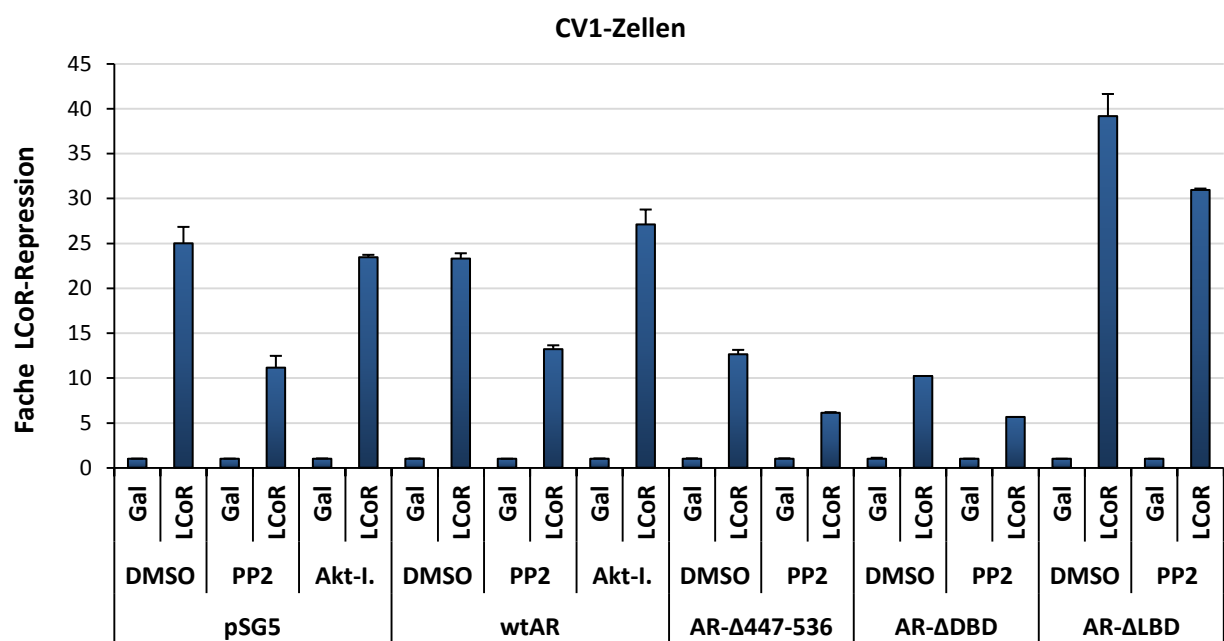
induzierte zelluläre Seneszenz in LNCaP-Zellen vermittelt wird (Dissertation J. Rödiger, 2012). Da der Akt-Inhibitor keinen Effekt hat (Abb. 4.4B), verläuft die durch Src-Kinase-verstärkte LCoR-Repression über einen anderen Signalweg.

Die konstitutiv-aktive AR- Δ LBD-Mutante, welche ohne Hormon eine höhere Transaktivierung als der R1881-induzierte Wildtyp (wt)-AR zeigt (Asim *et al.*, 2011), fördert deutlich die LCoR-Repression. Auffällig ist, dass der negative Effekt durch PP2 abgeschwächt ist (Abb. 4.4B).

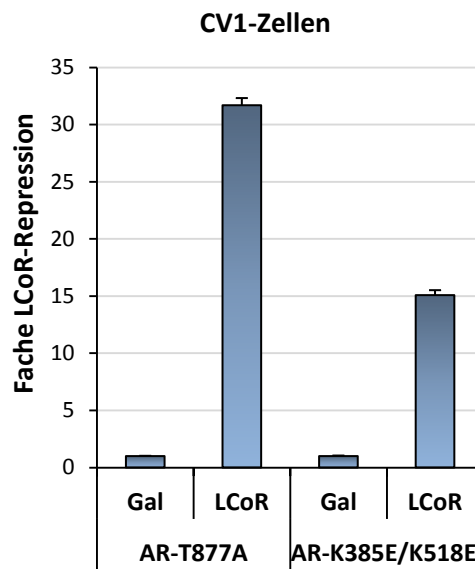
A



B



C



D

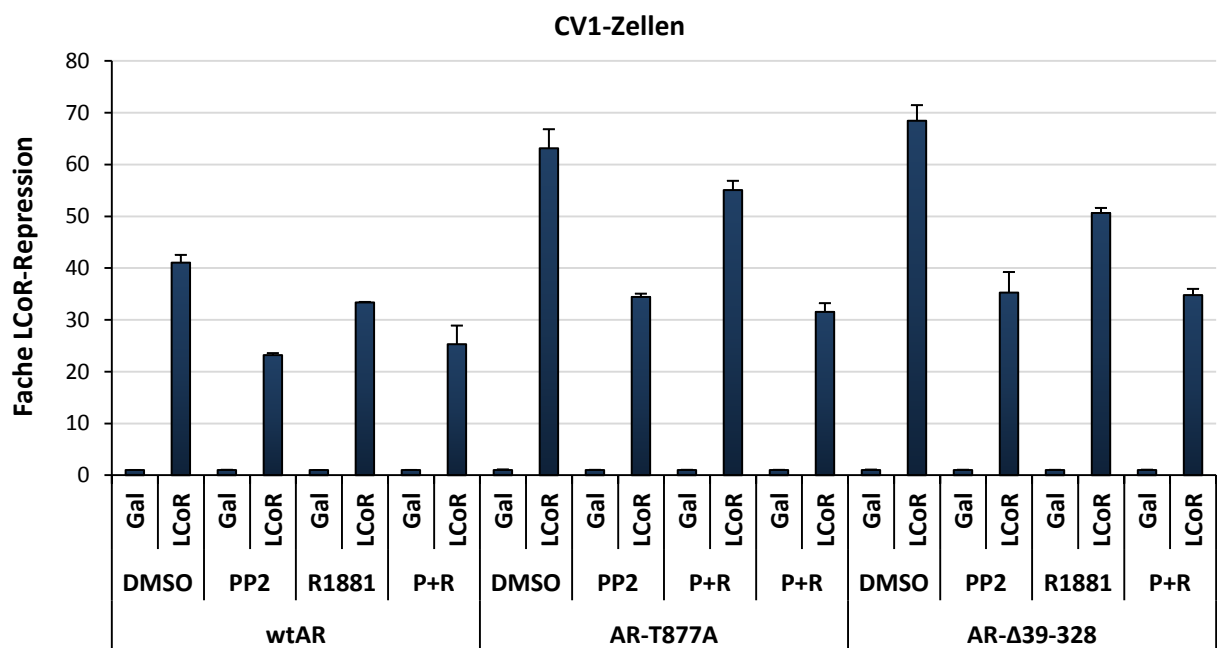


Abb. 4.4) Vergleichen zum wtAR steigern AR-T877A, AR-Δ39-328 sowie AR-ΔLBD die LCoR-Funktion, während AR-ΔDBD, AR-Δ447-536 und AR-K385E/K518E diese schwächen

A) Schema des AR-Proteins (Lonergan und Tindall, 2011) mit den verschiedenen Domänen unter Angabe der AS-Positionen. In der N-terminalen Domäne (NTD) befindet sich die ligandenunabhängige AF-1 (Aktivierungsfunktion 1), welche TAU (*Transcription Activation Unit*) 1 und 5 enthält. Die FxxLF und WxxLF Sequenzen vermitteln die N-C-Interaktion. An die NTD schließt sich die DNA-Bindedomäne (DBD), Hinge-Region und die Liganden-Bindedomäne (LBD) an. Unterhalb des Schemas sind die verwendeten AR-Deletionsmutanten dargestellt.

B-D) Die Reporterassays zur Messung der LCoR-Repression wurden in CV1-Zellen durchgeführt. Dazu wurden jeweils 50.000 Zellen in Hormon-depletiertem Medium in einem 6-Well ausgesät. 24 h später erfolgte die Transfektion mit 1 µg p4xUAS-TK-Luc, 0,5 µg pGal/ Gal-LCoR, 0,2 µg pCMV-LacZ und 2 µg pSG5/pSG5-AR bzw. die verschiedenen AR-Deletionsmutanten. Der Transfektionsansatz blieb für 16-18 h auf den Zellen. Behandelt wurde für 72 h in Hormon-depletiertem Medium mit 10^{-6} M PP2 bzw. Akt-Inhibitor (Akt-I.) und 10^{-9} M R1881 oder PP2 und R1881 zusammen (P+R). Gezeigt ist jeweils die fache LCoR-Repression, d. h. die mit der LacZ Aktivität normalisierten Luc-Werte, wobei Gal jeweils 1 gesetzt wurde. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung vom Mittelwert einer Zweifachbestimmung an.

AR-ΔDBD, welche nicht DNA binden kann und transkriptionell inaktiv ist, bewirkt hingegen eine verminderte LCoR-Funktion wie auch die Mutante mit deletierter 447-536 Region (Abb. 4.4B). Letztere könnte eine eingeschränkte TAU 5 (AS 369-493) haben, zeigt aber eine normale Transaktivierung im Reporterassay (Asim *et al.*, 2011). Die Domäne 447-536 enthält außerdem eine der zwei bekannten AR-SUMOylierungsstellen (K385, 518), welche für die LCoR-Funktion eine Rolle spielen könnten.

AR-SUMOylierung, welche durch Androgene gesteigert wird, bewirkt eine höhere AR Stabilität sowie eine schlechtere AR-Transaktivierung (Coffey und Robson, 2012; Poukka *et al.*, 2000). Interessant ist, ob Verlust dieser Modifikation mit der LCoR-Repression korreliert, da diese Stellen auch essentiell sind für die Bindung der CoR SMRT und Alien (Moehren *et al.*, 2007; Dotzlaw *et al.*, 2002). Die SUMOylierungsmutante AR-K385E/K518E (Abb. 4.4C), welche instabiler aber stärker transaktivierend ist (Coffey und Robson, 2012; Poukka *et al.*, 2000) und nicht von SMRT und Alien reprimiert werden kann, schwächt die LCoR-Repression ähnlich wie AR-Δ447-536.

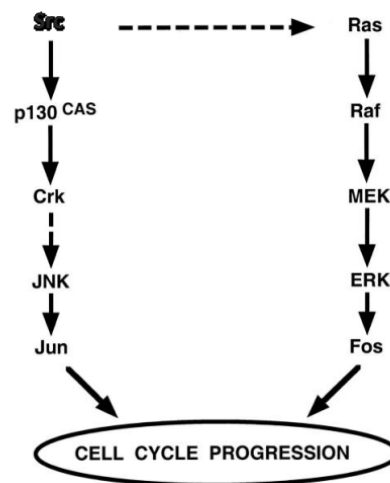
Die in LNCaP- und C4-2-Zellen exprimierte sowie in PCa nach OH-F Behandlung vorkommende und so durch OH-F aktivierte Mutante AR-T877A (Taplin *et al.*, 1999) erhöht die LCoR-Repression 1,5-fach verglichen zum wtAR. AR-Δ39-328, welcher fast vollständig die für die Transaktivierung nötige AF-1 fehlt und demzufolge stark in der transkriptionellen Aktivierung eingeschränkt ist (Asim *et al.*, 2011), verbessert die LCoR-Repression ähnlich stark (Abb. 4.4D). Diese Mutante enthält das für die intra- sowie intermolekulare N-C-Interaktion nötige FxxLFMotiv (AS 23-27), welche mit der AR-Transaktivierung einhergeht (Yuan *et al.*, 2013). Jedoch liegen für die Mutante keine Daten zu dieser Interaktion vor.

An der funktionellen LCoR-AR-Interaktion sind folglich die AR Bereiche DBD, 447-536 sowie die Positionen K385 und K518 beteiligt, während die AF-1 und die LBD hinderlich für die LCoR-Repression sind.

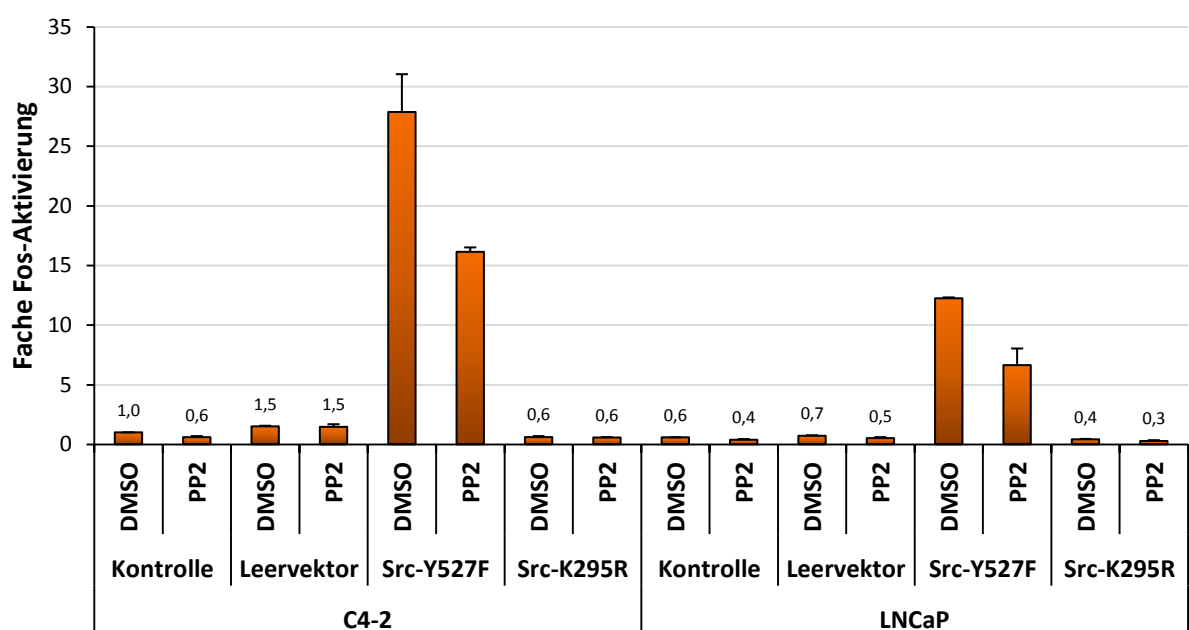
4.1.5) Konstitutiv-aktives Src erhöht die LCoR-Repression

Der Effekt von PP2 sollte mit Src-Mutanten bestätigt werden, da PP2 auch unspezifisch auf andere Mitglieder der Src-Kinase Familie wirkt. Zuerst erfolgte der Funktionsnachweis der Src-Mutanten in LNCaP- und C4-2-Zellen mit dem Reporter Fos-Luc. Dabei bindet Fos, welches mit Jun den TF AP-1 bildet und ein Src-Ras-Raf-Erk Target ist, an dessen Promotor und induziert die Luc Expression. Daher sollte zunächst die Fos Aktivität nach Transfektion der Src-Mutanten gemessen werden.

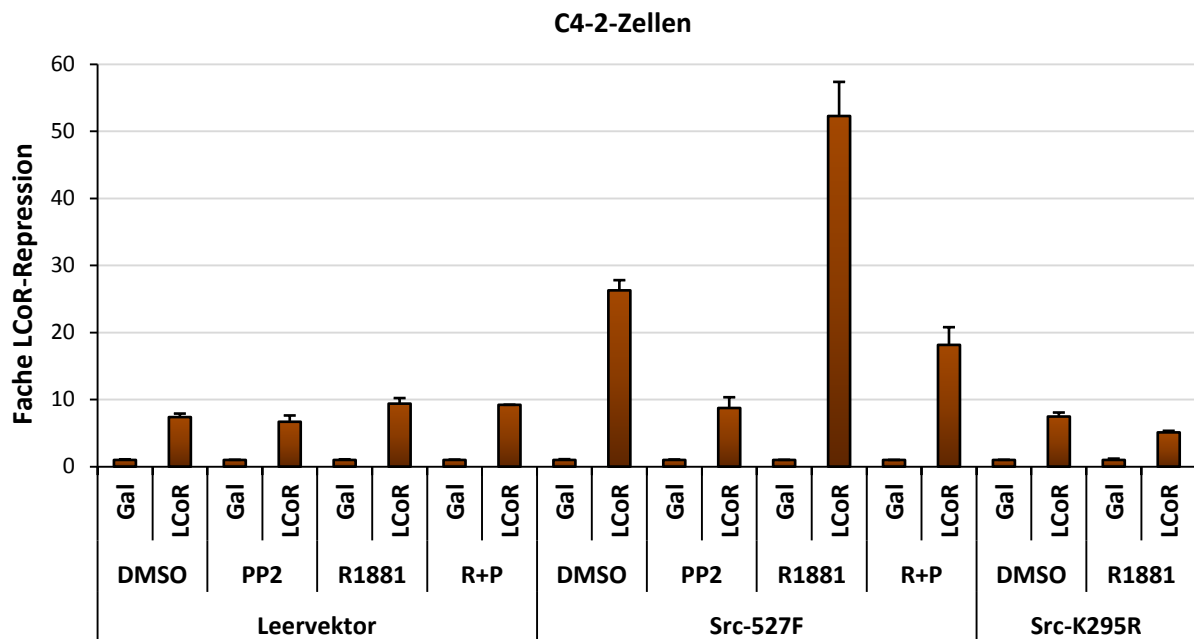
A



B



C



D

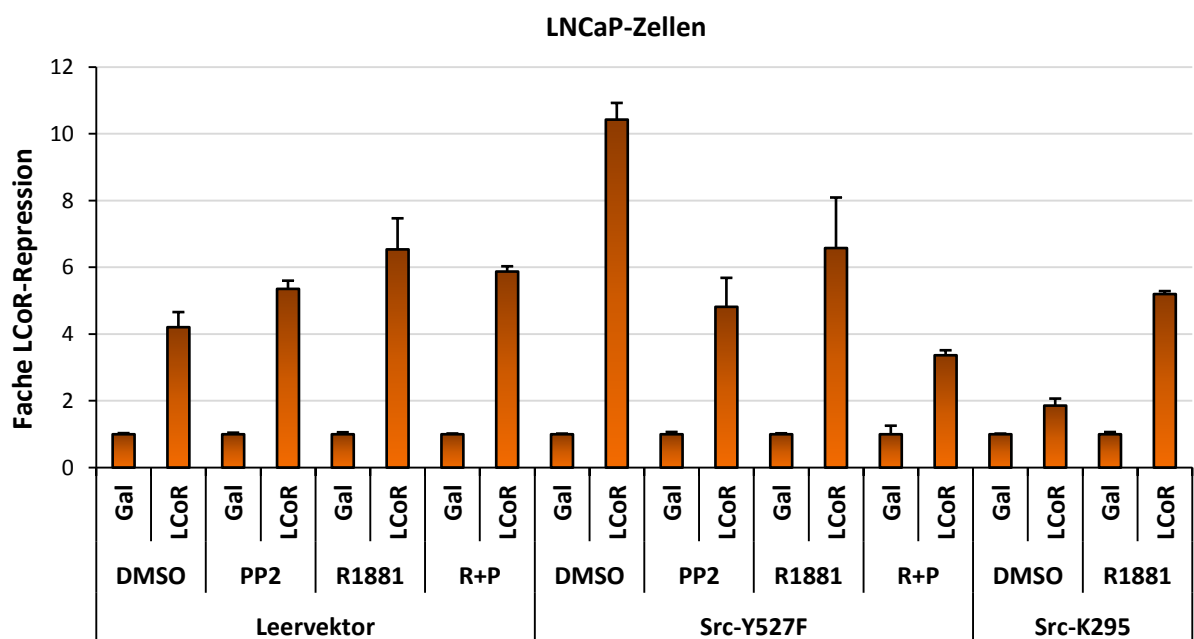


Abb. 4.5) Konstitutiv-aktives Src erhöht die LCoR-Repression, diese wird in C4-2-Zellen durch R1881 zusätzlich gesteigert, während sie in LNCaP-Zellen durch R1881 reduziert wird

A) Schema der Fos und Jun Aktivierung über die Src-Kinase aus Oktay *et al.* (1999). Fos wird über die Kinasen Ras, Raf, MEK und ERK aktiviert, während Jun über p130, Crk und JNK aktiviert wird.

B-D) Die Reporterassays zur Messung der Fos Aktivierung (B) bzw. LCoR-Repression (C, D) wurden wie zuvor (Abb. 4.3) in C4-2- und LNCaP-Zellen durchgeführt. Die Transfektion erfolgte mit 2 µg pFos-Luc (B) oder p4xUAS-TK-Luc (C: C4-2-Zellen, D: LNCaP-Zellen) mit jeweils 2 µg pGal/ Gal-LCoR,

1 µg pLPC (Leervektor) bzw. pLNCX-Src-Y527F (konstitutiv-aktiv) oder -K295R (dominant-negativ) und 0,2 µg pCMV-LacZ. In der Kontrolle bei B) wurde statt der Src-Plasmide Kalbsthymus-DNA eingesetzt. Außerdem sind dort die niedrigen fachen Aktivierungswerte über den Balken angegeben. Gezeigt ist die fache LCoR-Repression, d. h. die mit der LacZ Aktivität normalisierten Luc-Werte, wobei Gal jeweils 1 gesetzt wurde. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung vom Mittelwert einer Zweifachbestimmung an.

In C4-2-Zellen führt PP2 zur 1,7-fachen Hemmung des Fos-induzierten Reporters, wobei in LNCaP-Zellen nur eine 1,4-fache Inhibierung erreicht wird (Abb. 4.5B). Konstitutiv-aktives Src (Y527F) führt zur deutlichen Fos Aktivierung, was ebenfalls stärker in C4-2-Zellen ist. Dennoch ist diese hohe Aktivität gleichermaßen durch PP2 in beiden Zelllinien hemmbar. Dominant-negatives Src (K295R) bewirkt in beiden Zelllinien eine ähnlich niedrige Fos Aktivität wie die durch PP2 gehemmte endogene Src-Kinase, wobei diese Src-Mutante nicht weiter durch PP2 inhibiert werden kann. Die Src-Mutanten zeigen somit das erwartete Ergebnis in den PCa-Zellen und können zur Untersuchung der LCoR-Repression eingesetzt werden.

In C4-2-Zellen verhindert der Leervektor die Verstärkung durch R1881 (Abb. 4.5C). Die konstitutiv-aktive Src-Mutante bewirkt eine deutliche Erhöhung der LCoR-Repression. Die Reaktionen auf R1881 sowie die Kombination mit PP2 entsprechen dabei denen ohne cotransfizierter Src-Mutante. R1881 führt zur Aktivierung, welche durch PP2 inhibiert wird (Abb. 4.5C vgl. 4.3B). PP2 alleine schwächt bereits die durch Src-Y527F -verstärkte LCoR-Repression ab. Die Src-Inhibierung durch die dominant-negative Src-Kinase wirkt in C4-2-Zellen in Anwesenheit von R1881 gleichermaßen hemmend auf die LCoR-Repression wie der Src-Inhibitor PP2. Src-K295 beeinflusst des Weiteren im Gegensatz zu Src-Y527F nicht die basale LCoR-Funktion in C4-2-Zellen (Abb. 4.5C), so wie auch PP2 die basale LCoR-Repression nicht verändert.

In LNCaP-Zellen hat Src-Y527F ebenfalls einen fördernden Effekt auf die LCoR-Repression (Abb. 4.5D). Auch hier führt die zusätzliche Src-Inhibierung durch PP2 zur Hemmung dieser vermehrten LCoR-Repression. Allerdings führt R1881 in LNCaP-Zellen zur Hemmung der Src-Y527F-induzierten LCoR-Funktion, während in C4-2-Zellen die ansonsten durch R1881-verstärkte Wirkung auch bei Src-Y527F deutlich war. Dies korreliert in LNCaP-Zellen mit dem synergistischen Effekt von R1881 und PP2 (Abb. 4.3B). R1881 fördert zwar die LCoR-Repression, doch aktiver AR bei gleichzeitig aktiviertem Src-Signaling ist hinderlich für LCoR in LNCaP-Zellen. Aus diesem Grund könnte, entgegen der Wirkung in C4-2-Zellen, auch

R1881 die LCoR-Funktion bei dominant-negativen Src-K295 verstärken. Ohne Hormon jedoch ist bei Src-K295R die LCoR-Repression schwächer, was unterstreicht, dass der negative Src-Einfluss auf LCoR in LNCaP-Zellen nur bei aktivem AR besteht. In Abwesenheit von R1881 hingegen fördert *Src-Signaling* die LCoR-Repression wie in C4-2-Zellen.

Durch Cotransfektion der Src-Mutanten werden demzufolge die Ergebnisse mit PP2 bestätigt, so dass in LNCaP genau wie in C4-2-Zellen *Src-Signaling* in Abwesenheit von Androgenen einen positiven Einfluss auf LCoR hat. Währenddessen ist die Src-Kinase mit R1881, wie zuvor mit PP2 gezeigt, in LNCaP-Zellen hinderlich im Gegensatz zu C4-2-Zellen, bei welchen die Kombination aus R1881 und aktivem Src die LCoR-Repression fördert.

4.1.6) Ras ist an der Src-vermittelten LCoR-Funktionssteigerung in C4-2-Zellen beteiligt

Als nächstes stellte sich die Frage, durch welchen Effektor der Src-Kinase die LCoR-Repression erhöht wird. Hierzu wurde Ras ausgewählt, ein Membran-assoziiertes kleines G-Protein. Dieses wird durch Src aktiviert (Abb. 4.5A) und vermittelt dessen positiven Effekt auf die Proliferation von PCa-Zellen (Chang *et al.*, 2007).

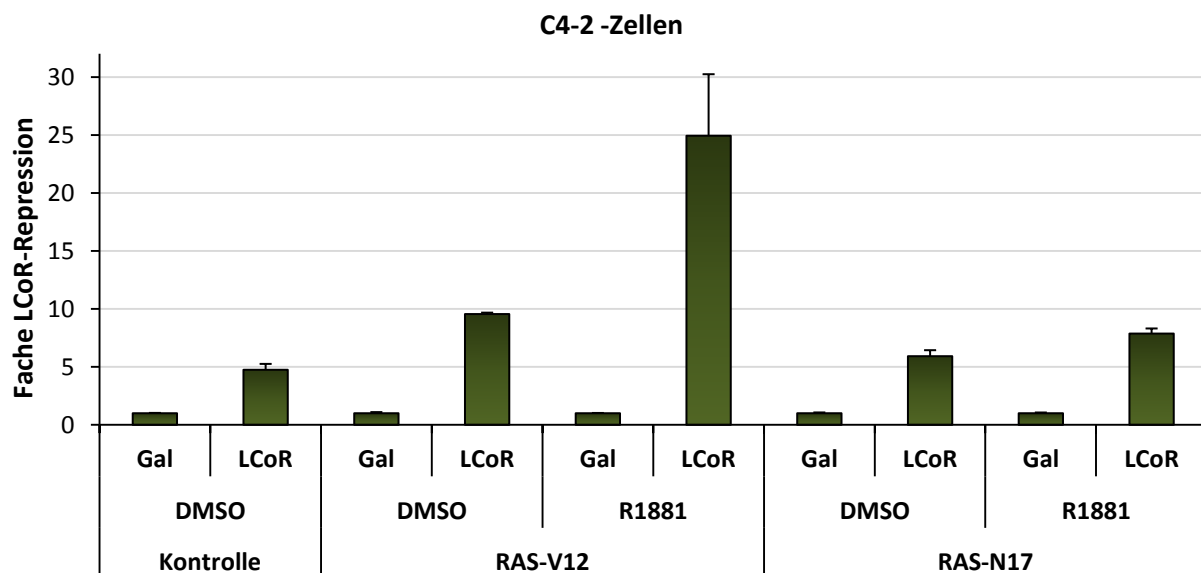


Abb. 4.6) Konstitutiv-aktives Ras erhöht die LCoR-Repression in C4-2-Zellen, während dominant-negatives Ras die R1881-induzierte LCoR-Repression abschwächt

Der Reporterassay zur Messung der LCoR-Repression wurde wie zuvor (Abb. 4.3A) in C4-2-Zellen durchgeführt. Transfiziert wurden 2 µg p4xUAS-TK-Luc, 2 µg pGal/Gal-LCoR, 1 µg pCEV-Ras-V12 (konstitutiv-aktiv) bzw. pcDNA3B-Ras-N17 (dominant-negativ) und 0,2 µg pCMV-LacZ. In der Kontrolle wurde statt der Ras-Plasmide Kalbsthymus-DNA eingesetzt. Gezeigt ist die fache LCoR-

Repression, d.h. die mit der LacZ Aktivität normalisierten Luc-Werte, wobei Gal jeweils 1 gesetzt wurde. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung vom Mittelwert einer Zweifachbestimmung.

Konstitutiv-aktives Ras (Ras-V12) fördert die LCoR-Funktion in C4-2-Zellen (Abb. 4.6). Entsprechend unterdrückt dominant-negatives Ras (Ras-N17) die Steigerung in Anwesenheit von R1881. Die Reaktion ist somit ähnlich wie auf die Src-Mutanten (Abb. 4.5C). Demnach kann vermutet werden, dass Ras als ein wichtiges Src Zielprotein und Aktivator der MAPK Kaskade, Raf-MEK-ERK, u. a. verantwortlich für die Src-vermittelte Steigerung der LCoR-Funktion in C4-2-Zellen ist.

4.1.7) Die LCoR-Repression kann in C4-2, im Gegensatz zu LNCaP-Zellen durch zusätzliches LCoR gefördert werden

Des Weiteren sollte indirekt mittels ektopischer LCoR Expression getestet werden, ob die endogene LCoR-Menge eventuell unterschiedlich in C4-2- und LNCaP-Zellen kompensiert werden kann und ob somit durch eine mutmaßlich vermehrte LCoR-Rekrutierung an den Gal-LCoR Komplex die Repression des Reportergens gesteigert werden kann.

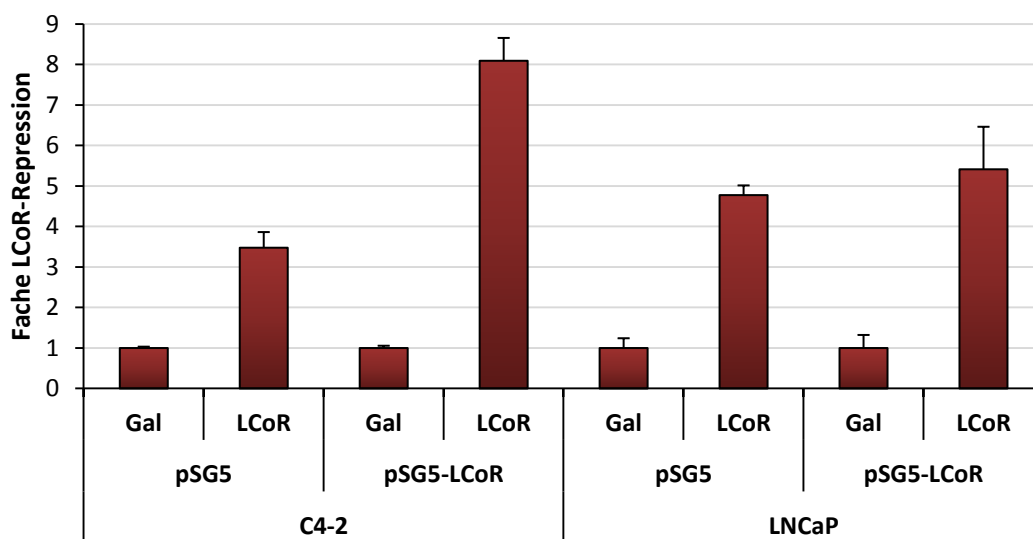


Abb. 4.7) Die Cotransfektion von LCoR erhöht in C4-2-Zellen, jedoch nicht in LNCaP-Zellen, die LCoR-Repression

Der Reportergenassay zur Messung der LCoR-Repression wurde wie zuvor (Abb. 4.3) in C4-2- und LNCaP-Zellen durchgeführt. Transfiziert wurden 2 µg p4xUAS-TK-Luc mit 2 µg pGal/Gal-LCoR, 1 µg pSG5/pSG5-LCoR und 0,2 µg pCMV-LacZ. Gezeigt ist die fache LCoR-Repression, d. h. die mit der LacZ Aktivität normalisierten Luc-Werte, wobei Gal jeweils 1 gesetzt wurde. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung vom Mittelwert einer Zweifachbestimmung an.

Tatsächlich ist eine erhöhte LCoR-Repression in C4-2-Zellen durch zusätzliche LCoR Transfektion, nicht jedoch in LNCaP-Zellen zu beobachten (Abb. 4.7). Dies lässt in C4-2-Zellen auf eine Rekrutierung von ektopisch exprimierten LCoR schließen.

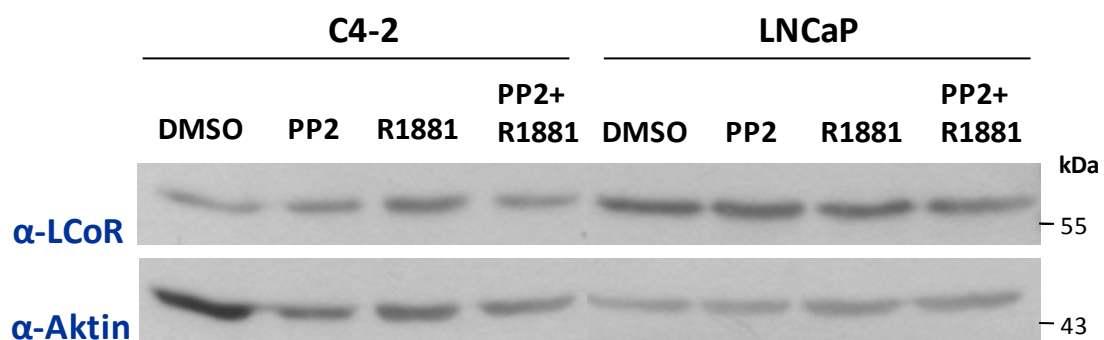
4.1.8) Src-Signaling und Androgene verändern die Proteinmengen von AR, LCoR und Src

Um herauszufinden, ob die durch R1881 und PP2 beeinflusste LCoR-Repression durch eine veränderte Biosynthese des LCoR-Proteins oder der beteiligten Proteine AR und Src bedingt ist, wurden Westenblot-Analysen in den wie zuvor behandelten C4-2- und LNCaP-Zellen durchgeführt. So könnte die Proteinmenge mit dem LCoR-Repressionsstatus korrelieren, wodurch ein möglicher Mechanismus identifiziert wäre.

In beiden PCa-Zelllinien wird die AR-Proteinmenge durch den Src-Inhibitor nicht beeinflusst, während durch R1881 erwartungsgemäß eine Stabilisierung eintritt (nicht gezeigt, Furutani *et al.*, 2002). Weiterhin gibt es eine synergistische AR Zunahme durch gleichzeitige Androgen und PP2 Behandlung in C4-2-Zellen, während in LNCaP-Zellen die Src-Inhibierung die durch R1881 erhöhte AR-Menge wieder rückgängig macht (nicht gezeigt). In beiden PCa-Zelllinien besteht somit keine Korrelation zwischen der AR-Menge und der LCoR-Repression.

Die LCoR-Proteinmenge wird in C4-2-Zellen durch den Src-Inhibitor sowie etwas stärker durch R1881 hochreguliert (Abb. 4.8), was durch die kombinatorische Behandlung mit PP2 wieder aufgehoben wird. Somit ist die Änderung der LCoR-Proteinmenge in C4-2-Zellen mit der LCoR-Repression nach AR Aktivierung sowie gleichzeitiger Src-Inhibierung assoziiert.

In LNCaP-Zellen wird die LCoR-Proteinmenge durch PP2, entgegen der Wirkung in C4-2-Zellen, nicht beeinflusst (Abb. 4.8). R1881 führt zur Verringerung, auch bei gleichzeitig inhibierter Src-Kinase, was im Gegensatz zur gesteigerten LCoR-Funktion (vgl. Abb. 4.3B) sowie zu den Änderungen der LCoR-Menge in C4-2-Zellen steht.



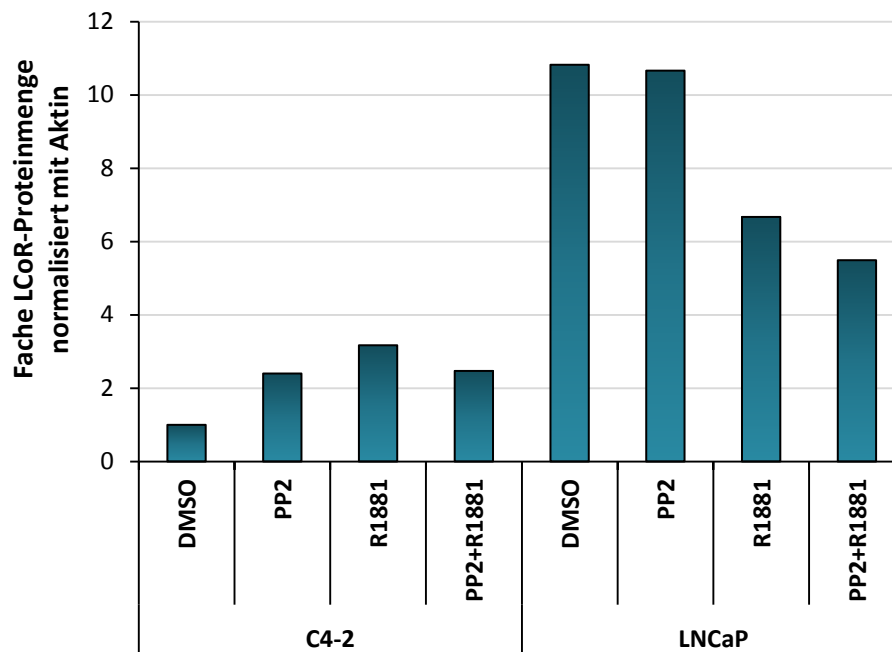


Abb. 4.8) In C4-2-Zellen korreliert die Androgen-vermittelte Erhöhung der LCoR-Proteinmenge sowie der leicht antagonistische Effekt durch PP2 mit der LCoR-Repression

Die Westernblots gegen LCoR (α -LCoR) sowie Aktin zur Normalisierung wurden in C4-2- und LNCaP-Zellen durchgeführt. Dazu wurden jeweils 300.000 Zellen in je zwei 6-Well in Hormon-depletiertem Medium ausgesät und nach 16-18 h mit 10^{-9} M R1881 bzw. 10^{-6} M PP2 für 72 h behandelt. Unterhalb der Westernblots ist die mit Aktin normalisierte und quantifizierte fache LCoR-Proteinmenge dargestellt, wobei der Wert der DMSO behandelten C4-2-Zellen 1 gesetzt wurde.

Auffällig ist, dass in LNCaP-, verglichen zu C4-2-Zellen, ca. dreifach mehr AR-Protein vorhanden ist (Abb. A1), während bei LCoR der Unterschied wesentlich stärker ist (Abb. 4.8), so dass insgesamt das Verhältnis von LCoR zu AR in C4-2-Zellen geringer ist.

Neben dem f.l. AR traten auch zwei deutliche untere Banden auf, welche verkürzte AR-Isoformen repräsentieren könnten (Abb. 4.9). In C4-2-Zellen ist zusätzlich noch eine weitere Bande dazwischen zu erkennen. Die untere und stärkere Bande könnte in beiden Zelllinien auf die ca. 67 kDa große AR8 Splicevariante mit fehlender DBD und LBD sowie einzigartigem C-Terminus hindeuten, welche in CRPC-Zellen hochreguliert ist (Yang *et al.*, 2011). Die obere Bande könnte der Isoform AR3, welcher nur die LBD fehlt, entsprechen. Diese konstitutiv-aktive, ligandenunabhängige AR Splicevariante sorgt für kastrationsresistentes PCa-Wachstum *in vivo* (Watson *et al.*, 2010).

Es ist deutlich, dass beide verkürzte AR Varianten in LNCaP-Zellen häufiger auftreten als in C4-2-Zellen (Abb. 4.9), jedoch ist die Verstärkung durch die Behandlung in C4-2-Zellen wesentlich ausgeprägter. Dabei werden in diesen Zellen die AR Deletionen durch PP2, R1881

sowie etwas stärker durch die Kombination hochreguliert. Auch verglichen zum f.l. AR ist in C4-2-Zellen die Induktion der Menge der AR-Splicevarianten um ein vielfaches höher.

Als nächstes folgte die Untersuchung der Src-Proteinmengen. Von diesen können allerdings keine Rückschlüsse auf die Src-Aktivität gemacht werden (Xu *et al.*, 2012). Dies erklärt, dass PP2 nicht die Src-Menge beeinflusst (nicht gezeigt). Die Src-Menge korreliert auch nicht mit der Aggressivität, Androgenunabhängigkeit sowie Proliferationsrate in den verschiedenen PCa-Zellen (Xu *et al.*, 2012).

Generell sind wie bei AR und LCoR auch höhere Src-Proteinmengen (knapp zweifach) in LNCaP- als in C4-2-Zellen zu verzeichnen. R1881 erhöht die Src-Menge in beiden PCa-Zelllinien, was in C4-2-Zellen jedoch deutlich stärker ist (nicht gezeigt).

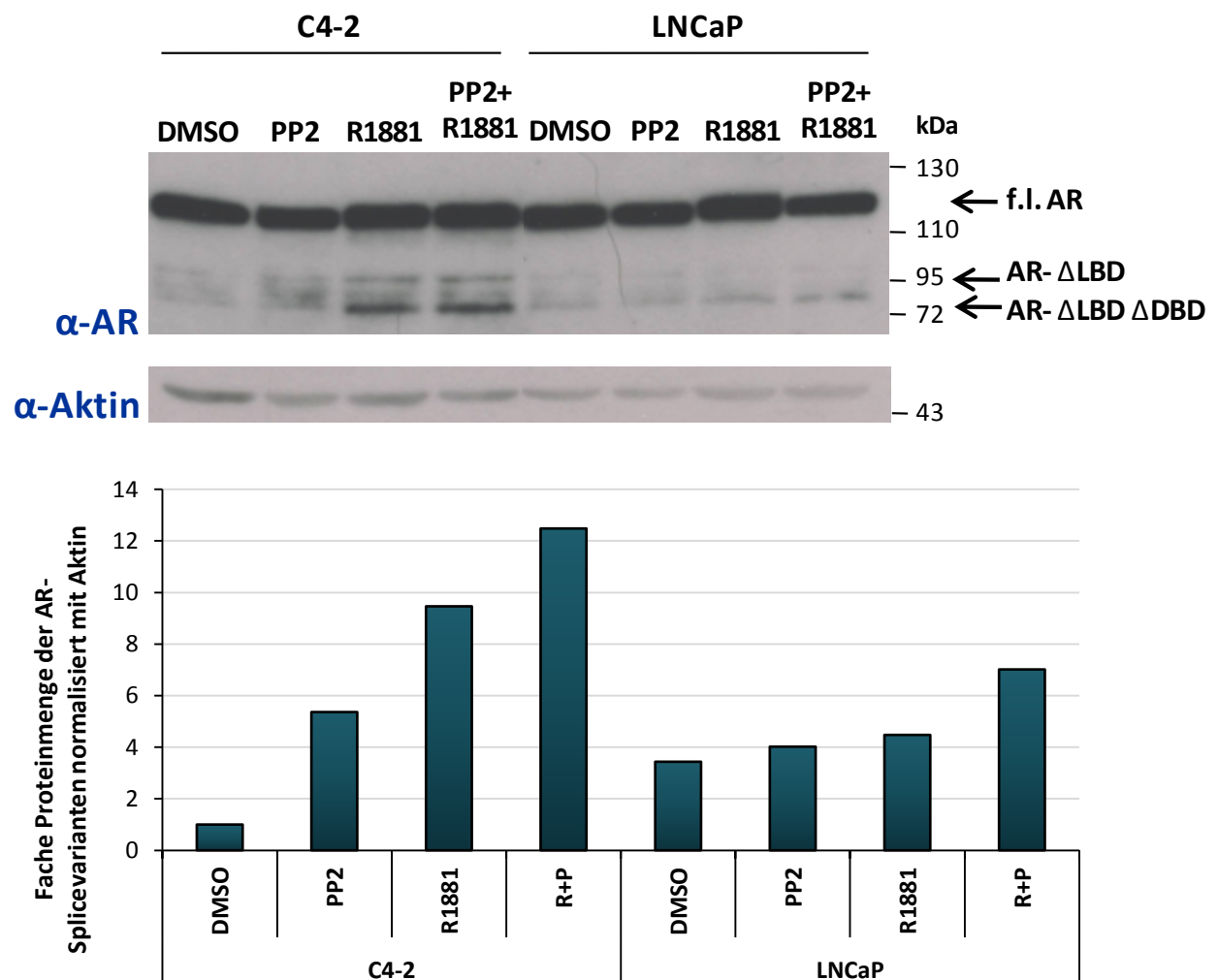


Abb. 4.9) Die Menge der AR-Splicevarianten wird durch R1881 und PP2 ähnlich beeinflusst wie der f.l. AR, in C4-2-Zellen sind die Effekte deutlich stärker

Die Westernblots gegen AR (α -AR) sowie Aktin zur Normalisierung wurden in C4-2- und LNCaP-Zellen durchgeführt. Die Behandlung erfolgte wie in Abb. 4.8. Die mutmaßlichen AR-Isoformen unterhalb

der starken f.l. AR Bande sind gekennzeichnet. Unterhalb der Westernblots befinden sich die mit Aktin normalisierten und quantifizierten fachen Proteinmengen, aller drei erkennbaren AR-Isoformen insgesamt. Der Wert der DMSO behandelten C4-2-Zellen wurde 1 gesetzt. R+P bedeutet R1881+PP2.

Schließlich korreliert die R1881-vermittelte Funktionssteigerung von LCoR in beiden Zelllinien mit der durch R1881 hervorgerufenen AR- sowie Src-Proteinstabilisierung. In C4-2-Zellen besteht außerdem ein Zusammenhang zwischen der Regulation der LCoR-Repression und der veränderten LCoR-Proteinmenge durch R1881 und auch PP2.

Zusammenfassend konnte für die zwei mutmaßlich AR-bindenden LCoR-Domänen 101-218 und 219-433 eine direkte und voneinander unabhängige Interaktion mit der AR-DBD *in vitro* nachgewiesen werden.

Es zeigte sich in den LNCaP-Zellen eine R1881-verstärkte LCoR-Repressionsfunktion, welche durch PP2 weiter gesteigert wird. *Src-Signaling* scheint daher in Kombination mit R1881 negativ in diesen androgenabhängigen Zellen zu sein, wohingegen ohne R1881 die konstitutiv-aktive Src-Kinase förderlich ist. In C4-2-Zellen unterstützt diese, vermittelt u. a. durch Ras, ebenfalls die LCoR-Repression, welche außerdem wie in LNCaP-Zellen durch R1881 verstärkt wird. Die Steigerung wird allerdings im Gegensatz zu LNCaP-Zellen durch PP2 gehemmt. Die LCoR-Bindung zum AR verhält sich in ähnlicher Weise in diesen androgenunabhängigen Zellen, so dass hier *Src-Signaling* positiv für LCoR, unabhängig vom AR Aktivierungsstatus, ist.

4.1.9) Herstellung neuartiger CoR

Aufgrund der komplexen und inkonsistenten Regulation von LCoR durch *Src-Signaling* ist die Anwendung der LCoR-Domänen zu riskant. Insbesondere in LNCaP-Zellen reagiert die LCoR-Funktion sensitiv auf die getesteten Veränderungen. So hat die Src-Kinase je nach AR Aktivierungsstatus gegensätzliche Effekte auf die LCoR-Repression. Andererseits ist der Einfluss von R1881 verschieden in Abhängigkeit der Src-Aktivität. Denn R1881 fördert die LCoR-Repression bei inaktiver Src-Kinase, hemmt diese jedoch bei gleichzeitigem *Src-Signaling*, in C4-2-Zellen ist es umgekehrt.

Außerdem wirkt sich zwischen den nah verwandten Zelllinien der Src-Inhibitor gegensätzlich auf die R1881-verstärkte LCoR-Repression aus, was bereits die Bindung zum AR zu betreffen scheint. Analog besteht zwischen den Zelllinien die Diskrepanz der androgenen Wirkung hinsichtlich der Src-Aktivität. Demnach ist die Wirksamkeit in PCa-Tumoren schwer

abschätzbar, welche oft heterogen sind bezüglich der Abhängigkeit von Androgenen und wodurch der Einfluss von R1881 und der Src-Kinase absolut verschieden sein könnte. Vor allem ist es ein großer Nachteil, dass in den androgenabhängigen Zellen die Regulation von LCoR durch Src je nach Verfügbarkeit von Androgenen konträr ist. Dies würde bei einer potenziellen Therapie die Bestimmung der Src-Kinase Aktivität sowie die Erzeugung entsprechender Hormonkonzentrationen erfordern. Da bereits die zwei getesteten Einflussgrößen widersprüchliche Effekte haben, ist davon auszugehen, dass die Regulation von LCoR sehr komplex und vor allem variabel ist. Dies würde bei einem Einsatz eine beständige Wirkung sowie Vorhersagbarkeit stark einschränken.

Daher wurden für die Generierung eines neuen spezifischen CoR zur konstanten AR-Bindung sowie Inhibierung künstliche ca. 30 AS lange PA an die humane Transrepressionsdomäne SUMO_{G97A} fusioniert (Reeb und Gerlach *et al.*, 2011). Aufgrund der geringen Größe und der synthetischen AS-Sequenz sind die Regulationsmöglichkeiten der Bindung zum AR durch zelluläre Signalwege geringer und auch umgekehrt ist es unwahrscheinlicher, dass andere Faktoren außer dem AR reguliert werden.

4.2) Aufreinigung der PAB-CoR-Peptide und Funktionsanalyse in PCa-Zellen

Zur Generierung zellpermeabler Peptide für eine zukünftige potenzielle Therapie ohne Einsatz riskanter DNA-Vektoren wurde an die SUMO-PA(524)-Fusion eine PTD angehängt. Dadurch entstand das sogenannte zellpermeable Peptidaptamer-basierte CoR (PAB-CoR) Peptid 9R-524, welches den AR sowie das Wachstum von LNCaP-Zellen effizient inhibiert (Reeb und Gerlach *et al.*, 2011). Im Weiteren sollte die bisher geringe Ausbeute dieses Peptids sowie eines zusätzlichen, 9R-513 (Diplomarbeit M. Heißenmann, 2010), verbessert werden und anschließend die Wirkung in weiteren Zelllinien sowie die molekularen Mechanismen untersucht werden.

4.2.1.) Einfluss von AR-Liganden auf die Interaktion zwischen GST-9R-524 und dem AR

Zunächst sollte, wie für die LCoR-Domänen, anhand eines GST-Pulldowns die physikalische Interaktion zwischen 9R-524 und dem in LNCaP-Zellen enthaltenen AR-T877A in Anwesenheit verschiedener AR-Liganden getestet werden. Dabei dient 9R als Negativkontrolle, welchem lediglich das PA fehlt. Nach Optimierung der Expressions- bzw.

Isolierungseffizienzen der GST-Fusionen und Erhöhung der Spezifität durch einen Blockschritt sowie geringerer Detergenzkonzentration ist deutlich, dass GST-9R-524 spezifisch mit dem AR interagiert (Abb. 4.10). Es ist nur eine leichte Bindung des Kontrollpeptids vorhanden, die entweder durch die PTD 9R oder die SUMO Domäne erzeugt wird, da GST alleine keine AR-Interaktion zeigt. Die absolute Bindung zwischen 9R-524 und AR wird durch R1881 deutlich verstärkt, so wie es auch bei LCoR beobachtet wurde (Abb. 4.2). Etwas weniger stark ist die Interaktion in Anwesenheit der Antagonisten OH-F und Cas, bei Letzterem bindet allerdings auch 9R stark. Mit CPA hingegen ist die Interaktion schwächer, verglichen zur unbehandelten Kontrolle. Die höchste relative bzw. spezifische AR-Bindung (GST-9R-524 gegenüber GST-9R) besteht in Gegenwart von OH-F, gefolgt von R1881 und der Abwesenheit von Hormonen.

Folglich konnte eine PA-spezifische Interaktion zwischen 9R-524 und dem AR *in vitro* bestätigt werden, welche durch die AR-Liganden R1881 und OH-F verstärkt wird.

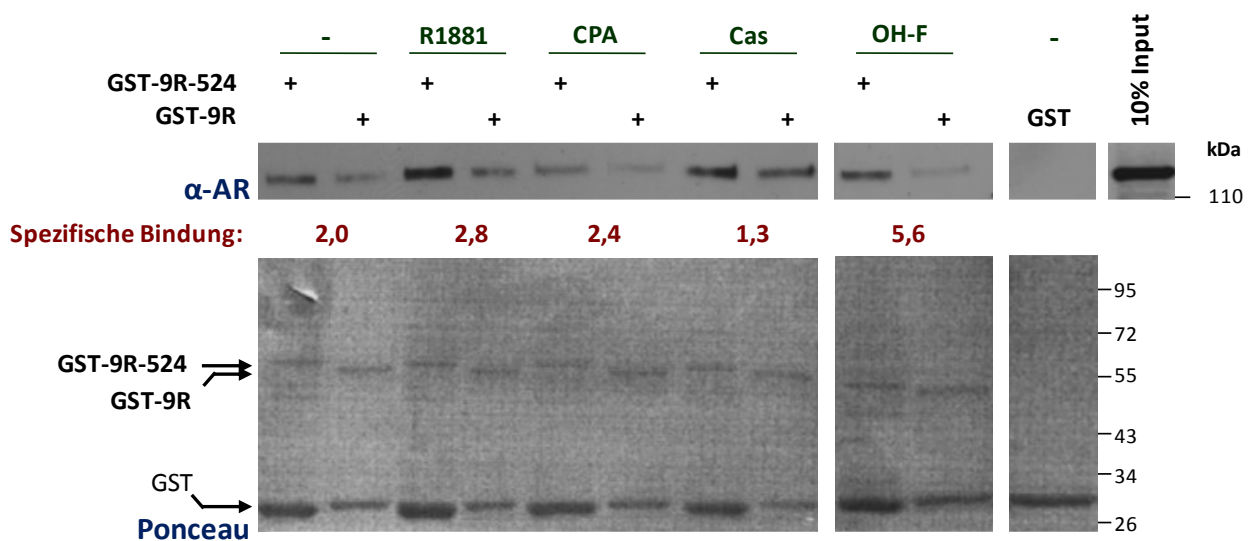


Abb. 4.10) 9R-524 zeigt eine spezifische AR-Bindung *in vitro*, welche mit R1881 und dem Antiandrogen OH-F verstärkt ist

Der Westernblot gegen AR (α -AR) erfolgte nach dem GST-Pulldown. Dazu wurde der *E. coli* Extrakt für GST (20 μ l) sowie GST-9R bzw. GST-9R-524 (je 100 μ l) mit jeweils 20 μ l Glutathion Sepharose aufgereinigt. Die Beads wurden mit 5 %igem Milchpulver wie zuvor (Abb. 4.1B) abgesättigt. Anschließend wurden sie mit 0,5 mg LNCaP GZE-Protein, hergestellt mit 0,1 % NP-40-haltigen NETN-Puffer, in Anwesenheit der AR-Liganden 10^{-8} M R1881 und jeweils 10^{-7} M CPA, Cas und OH-F inkubiert. Gezeigt ist der α -AR Westernblot, wobei sich alle Proben auf derselben Membran befinden. Darunter ist die spezifische AR-Bindung (GST-9R-524 gegenüber GST-9R) angegeben, welche densitometrisch bestimmt wurde. Es wurde 10 % Input (50 μ g GZE) geladen, die Ponceau-Färbung dient als Ladekontrolle der GST-Fusionsproteine. Alle Spuren stammen vom selben SDS-Gel.

4.2.2) Wirkung der 9R-fusionierten PAB-CoR Konstrukte auf die Transaktivierung des wtAR und der AR-Mutanten

Nach Bestätigung der PA-abhängigen Bindung des neuen synthetischen Corepressorpeptids 9R-524 an den AR *in vitro* sollte dessen Wirkung nach Transfektion des entsprechenden Expressionsplamids auf die AR-Transaktivierung im Reporterassay untersucht werden. Neben dem wtAR wurden auch die in LNCaP- und C4-2-Zellen vorhandene AR-T877A-Mutante sowie die konstitutiv-aktive AR- Δ LBD-Mutante analysiert. Dabei wurde der ebenfalls vielversprechende CoR 9R-513 eingeschlossen, welcher nach Entfernung des bakteriellen Gerüstproteins TrxA weiterhin eine effiziente Reduktion der AR-Transaktivierung sowie des LNCaP-Zellwachstums bewirkt (Diplomarbeit M. Heimann, 2010).

Beide PAB-CoR Konstrukte hemmen die wtAR vermittelte Hormoninduktion (Abb. 4.11 links). 9R-524 inhibiert in Anwesenheit von 10^{-7} M CPA zweifach, mit 10^{-9} M R1881 besteht jedoch kein signifikanter Effekt auf den wtAR. 9R-513 hemmt hingegen diese Induktion zweifach, die CPA-verstärkte wtAR-Transaktivierung wird durch 9R-513 noch deutlicher inhibiert (3,5-fach) und ist somit auch stärker gegenüber der 9R-524 Wirkung.

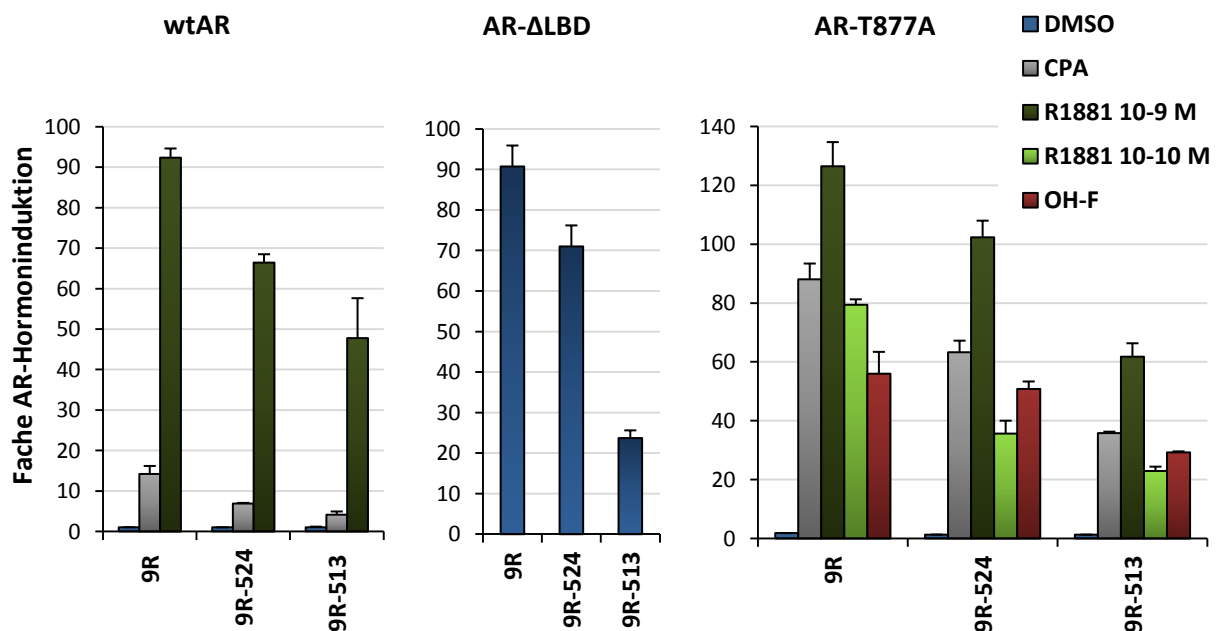


Abb. 4.11) 9R-513 hemmt die Transaktivierung des wtAR und AR-T877A nach Induktion mit R1881 sowie Antagonisten und zusätzlich AR- Δ LBD, während 9R-524 schwächer und nur mit vereinzelt Liganden wirkt

Die Reporterassays zur Messung der AR-Transaktivierung wurden in CV1-Zellen durchgeführt. Dazu wurden 50.000 Zellen in Hormon-depletiertem Medium in einem 6-Well ausgesät. Die Transfektion erfolgte nach 24 h mit 1 μ g pMMTV-Luc, 0,02 μ g pSG5-wtAR (links)/-AR- Δ LBD (Mitte)/-

AR-T877A (rechts), 1 µg pcDNA3-ATG-9R/-9R-524/-9R-513 sowie 0,2 µg pCMV-LacZ. Der Transfektionsansatz blieb für 16-18 h auf den Zellen. Behandelt wurde für 72 h in Hormon-depletiertem Medium mit DMSO, 10^{-7} M CPA, 10^{-9} M R1881 (dunkelgrün), 10^{-10} M R1881 (hellgrün) sowie 10^{-7} M OH-F. Gezeigt sind die mit der LacZ Aktivität normalisierten Luc-Werte als fache AR Hormoninduktion, wobei die Werte der unbehandelten Zellen, außer bei AR-deltaLBD, jeweils 1 gesetzt wurden. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung vom Mittelwert einer Zweifachbestimmung an.

Zusätzlich kann 9R-513 effizient (beinahe vierfach) die AR-ΔLBD-Mutante hemmen, welche konstitutiv und unabhängig von Liganden aktiv ist und durch 9R-524 nicht beeinflusst wird (Abb. 4.11 Mitte).

Die AR-T877A vermittelte Transaktivierung wird durch 9R-524 nur in Gegenwart von 10^{-10} M R1881 gehemmt (zweifach) und, wie bei dem wtAR, nicht mit 10^{-9} M R1881 (Abb. 4.11 rechts). Im Gegensatz dazu halbiert 9R-513 die durch 10^{-9} M R1881-induzierte AR-T877A Transaktivierung ähnlich stark wie die des wtAR. Mit der zehnfach niedrigeren R1881 Konzentration ist die Inhibierung noch stärker (3,4-fach), auch verglichen zu 9R-524. Mit OH-F und CPA wird währenddessen im Gegensatz zu 9R-524 eine halbierte Aktivität durch 9R-513 erreicht.

Dementsprechend inhibiert 9R-513 die AR-Transaktivierung effizienter und zeigt außerdem ein größeres Wirkspektrum hinsichtlich der getesteten AR-Liganden sowie auch der AR-Mutanten.

4.2.3) Einfluss aktiver PKA auf die 9R-524 und 9R-513 vermittelte Repression der AR-Transaktivierung

Von großer Bedeutung ist, ob die neuen CoR in der Lage sind, auch in der Anwesenheit von aktiver PKA das AR-responsive Reportergen zu hemmen. Denn die PKA-vermittelte Signaltransduktion führt zur androgenunabhängigen AR Aktivierung und trägt so zum therapieresistenten Tumorwachstum bei (Sadar *et al.*, 1999), ähnlich dem negativen Einfluss der Src-Kinase (Asim *et al.*, 2008), welche außerdem die R1881-verstärkte LCoR-Repression in LNCaP-Zellen reduziert (Abb. 4.3B). Da die aktive PKA die 9R-524 Bindung an den AR nicht abschwächt (Reeb and Gerlach *et al.*, 2011), war diese Kinase von besonderem Interesse.

Bei dem viralen MMTV Promotor des Reportergens verlieren die 9R-fusionierten PAB-CoR Konstrukte ihre Repressionsfunktion für die wtAR-Transaktivierung in Anwesenheit von aktiver PKA (nicht gezeigt). Währenddessen bleibt bei dem Promotor des humanen Probasin-Gens (pARR3) die reprimierende Wirkung von 9R-513 im Gegensatz zu 9R-524

bestehen, sowohl in Gegenwart von R1881 als auch CPA (Abb. 4.12). Die Cotransfektion aktiver PKA bewirkt dabei eine massive Steigerung der AR-Aktivität um das Fünffache, welche nach Androgen-Induktion durch 9R-513 fast halbiert wird. In Anwesenheit von CPA besteht eine 1,7-fache Hemmung, wodurch schließlich die Repression ähnlich effektiv ist wie in Abwesenheit ektopischer PKA Expression. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass die Repressionsfunktion von SUMO nicht durch die PKA beeinträchtigt wird (nicht gezeigt).

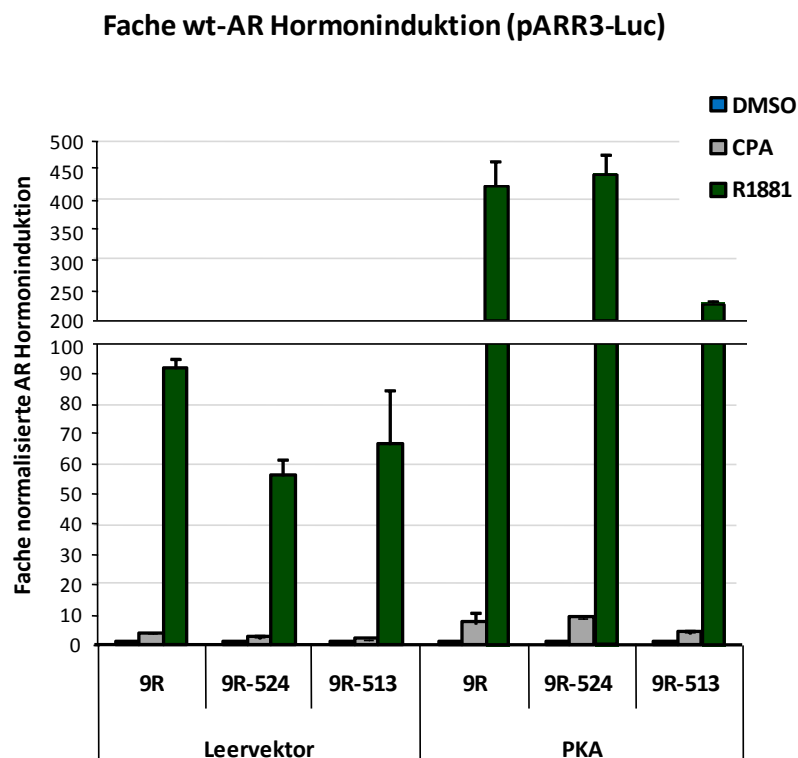


Abb. 4.12) Bei zusätzlich transfizierter aktiver PKA hemmt 9R-513 weiterhin die wtAR-Transaktivierung des pARR3(Probasin)-Promotors

Der Reporterassay zur Messung der AR-Transaktivierung wurde in CV1-Zellen durchgeführt. Dazu wurden 50.000 Zellen in Hormon-depletiertem Medium in einem 6-Well ausgesät. Die Transfektion erfolgte mit 1 µg pARR3-Luc, 0,02 µg pSG5-wtAR, 1 µg pcDNA3-ATG-9R/-9R-524/-9R-513, 1 µg pABΔgal (Leervektor) bzw. pRSV-PKA sowie 0,2 µg pCMV-LacZ. Der Transfektionsansatz blieb für 16 - 18 h auf den Zellen. Behandelt wurde für 72 h in Hormon-depletiertem Medium mit DMSO, 10^{-9} M R1881 oder 10^{-7} M CPA. Gezeigt sind die mit der LacZ Aktivität normalisierten Luc-Werte als Hormoninduktion, wobei der Wert der unbehandelten Zellen jeweils 1 gesetzt wurde. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung vom Mittelwert einer Zweifachbestimmung an.

Neben dieser effizienten AR-Bindung und -Inhibierung durch die neuartigen CoR, wobei insbesondere 9R-513 aufgrund der stärkeren Effekte, des breiteren AR-Mutanten- und Ligandenspektrums sowie des Funktionserhalts bei aktiver PKA vielversprechend ist, reduziert 1 µM 9R-524 Peptid das LNCaP Wachstum. Darüber hinaus inhibiert es deren PSA-

Expression, sowohl in Gegenwart von R1881 und OH-F als auch ohne Hormonzugabe (Reeb und Gerlach *et al.*, 2011).

Allerdings ist es für eine umfassende Charakterisierung dieser PA-basierten CoR erforderlich, die bakterielle Expression sowie die über GST-vermittelte Affinitätsaufreinigung zu optimieren, da die Peptidausbeute gering ist und es zusätzlich zum massiven Verlust während der Abspaltung des GST-Tags durch Thrombin kommt (Diplomarbeit C. Gerlach, 2008). Durch nicht sofortiges Abkühlen auf die Expressionstemperatur, Änderung der Expression von 16°C über Nacht (üN) auf 4°C für 72 h sowie durch Zusatz von Protease-Inhibitoren während der bakteriellen Proteinextraktion konnte wesentlich mehr 9R-524 Peptid gewonnen werden (nicht gezeigt). Weiterhin sind neben der Cotransformation von in *E. coli* seltenen tRNAs auch eine kürzere Thrombin-Inkubation von üN auf 5 h und der Wechsel des herkömmlichen Spaltungspuffers (Dissertation M. Eckey, 2001) zu PBS sehr vorteilhaft (nicht gezeigt). Trotz aller Optimierungen ist die PAB-CoR-Peptid Ausbeute weiterhin gering. Darüber hinaus liegt der Anteil nur bei 15 % (nicht gezeigt), wodurch diese Proteinlösung für die Anwendung als AR-spezifischer CoR nicht geeignet ist, da zu viele Nebeneffekte zu erwarten sind. Deshalb sollte ein anderes Aufreinigungssystem verwendet werden, welches möglicherweise zur effektiveren und reineren Peptidisolierung führt.

4.2.4) Aufreinigung der PAB-CoR-Peptide als His-Fusion mittels Nickel (Ni) -NTA Agarose

Da generell die rekombinante Biosynthese kleinerer Proteine effizienter ist, sollte für die Herstellung der PAB-CoR-Peptide der nur sechs AS große His-Tag verwendet werden, wodurch die Fusionsproteine verglichen zu GST (26 kDa) in etwa nur halb so groß sind. Unter durchgehend nativen Bedingungen führte die Affinitätsaufreinigung mit Ni-NTA-Agarose zur unspezifischen Proteinanreicherung. Dennoch konnte dabei durch Verlängerung der Kopplungszeiten sowie Imidazol im Bindepuffer für mehr Stringenz die Ausbeute erhöht werden. Verschiedene Sonifizierstärken und Volumina des bakteriellen Proteinextrakts haben jedoch keinen Einfluss (Daten nicht gezeigt). Die denaturierende Bakterienlyse mit anschließenden Hybridkonditionen (Kopplung und erste Waschschriffe denaturierend, letzte Waschschriffe sowie Eluierung nativ zur Peptidrückfaltung) stellte sich als geeigneter hinsichtlich Reinheit und Ausbeute heraus, auch verglichen zu durchgängig denaturierenden Bedingungen (nicht gezeigt). Letztere könnten aufgrund stringenterer Verhältnisse zum Verlust führen.

Für die Proteinextraktion ist Guanidin-Hydrochlorid (G-HCl) förderlicher als Harnstoff (Abb. 4.13 vgl. Spur 4 und 6 bzw. 5 und 7). Aufgrund der geringen Eluierungseffizienz, wodurch His-9R-524 unterhalb der Coomassie Nachweisgrenze liegt (nicht gezeigt), scheint es eine hohe Affinität zu den Ni-NTA Beads zu haben.

Direkt nach der bakteriellen Proteinextraktion tritt das His-9R-524 Peptid deutlich in den Vordergrund (Spur 1 und 2). Die fehlende IPTG-Induktion (Spur 3) als Negativkontrolle verifiziert die mutmaßliche His-9R-524 Bande als rekombinantes Peptid. Der Zusatz von Lysozym erhöht die Ausbeute dabei leicht (Abb. 4.13 vgl. Spur 1 und 2) sowie auch die des aufgereinigten Peptids nach Extraktion mit Harnstoff (vgl. Spur 6 und 7), jedoch nicht bei G-HCl (vgl. Spur 4 und 5).

Es wurde auch ein unterschiedlicher pH-Wert für die denaturierenden Waschpuffer getestet. Dabei ist der im Standardprotokoll verwendete pH von 5,3 geeigneter als 4,0 (vgl. Spur 4 und 8). Offensichtlich sind diese Bedingungen, ähnlich der vollständig denaturierenden Aufreinigung, zu stringent und führen zum Verlust von His-9R-524.

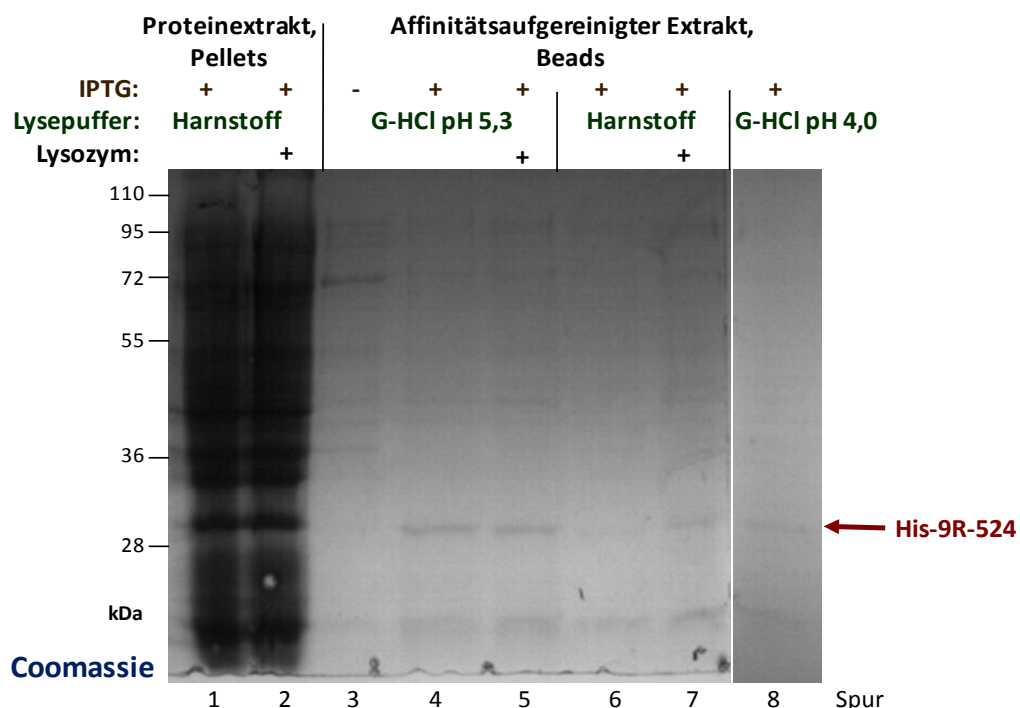


Abb. 4.13) Für die Proteinextraktion zur Affinitätsaufreinigung der His-Fusionen ist Guanidin-Hydrochlorid (G-HCl) besser geeignet als Harnstoff

Die Coomassie-Färbung zeigt die Pellets des bakteriellen Proteinextraktes und die mit Ni-NTA-Agarose aufgereinigten und an Beads gekoppelten His-9R-524 Peptide. Verglichen wurden Harnstoff- und G-HCl (bei zwei unterschiedlichen pH-Werten)-basierte Puffer zur Bakterienlyse. Dazu wurde der *E. coli* Extrakt für GST-9R-524 (80 µl) mit 20 µl Ni-NTA-Agarose unter Hybridkonditionen aufgereinigt.

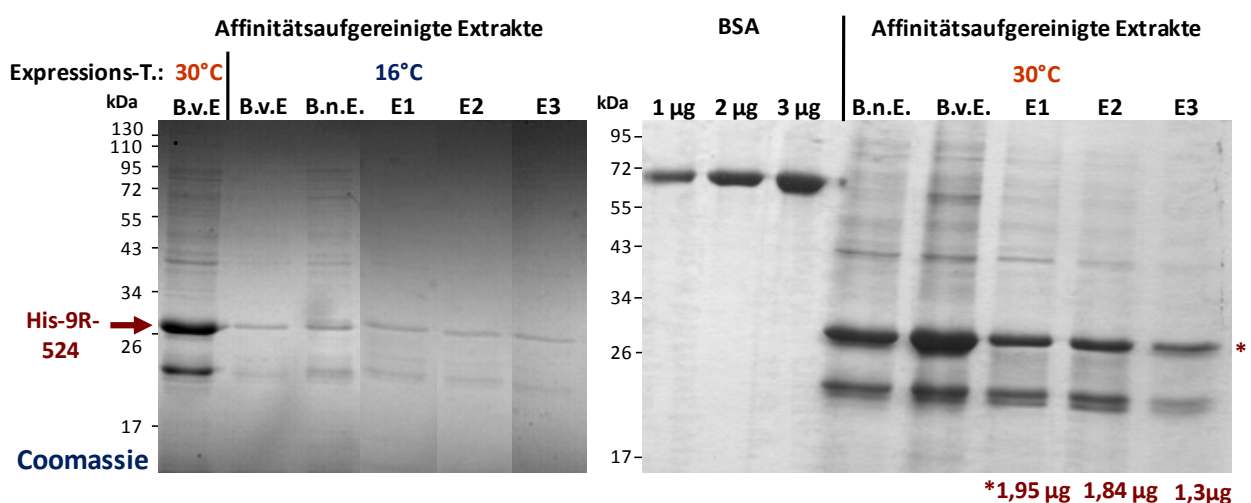
Für die Elektrophorese der Bakterienpellets wurden nur Harnstoff-basierte Extrakte verwendet, da G-HCl durch SDS ausfällt. Für die PAGE wurden jeweils 20 µl Pellets bzw. Beads mit SDS-Ladepuffer aufgekocht und auf das Gel geladen. Alle Spuren stammen vom selben SDS-Gel.

Des Weiteren wurde anhand des Einsatzes verschiedener Mengen an bakteriellen Proteinextrakt und wiederholter Inkubation der Beads sichergestellt, dass diese mit der nach dem Hersteller angegebenen Proteinextraktmenge abgesättigt sind (nicht gezeigt).

Schließlich konnte mehr Stringenz mit dem His-Tag verglichen zu GST erreicht werden, es sind lediglich zwei deutliche Banden vorhanden, wobei die untere höchstwahrscheinlich ein abgebautes bzw. verkürzt translatiertes His-9R-524 Peptid darstellt. Somit entstehen weniger Nebenprodukte als bei der Aufreinigung über GST, was möglicherweise auf geringeren Proteinabbau hindeutet und zeigt, dass 9R-524 durch die His-Fusion definitiv spezifischer angereichert werden kann.

Durch einen Wechsel der Expressionstemperatur von 16°C auf 30°C wurde die densitometrisch ermittelte Peptidausbeute außerdem 20-fach gesteigert (Abb. 4.14A). Die Quantifizierung mit Hilfe eines BSA Standards ergab in den ersten beiden Eluaten durchschnittlich knapp 0,1 µg/µl an spezifischen His-9R-524 Peptid. Neben dem Testen verschiedener Expressionsbedingungen sollte die weiterhin ineffiziente Eluierung durch stringenteren Puffer verbessert werden. Dabei stellte sich für die Expression von 9R-524 eine Temperatur von 30°C bei einer Induktion mit 0,2 mM IPTG sowie 750 statt 350 mM Imidazol während der Eluierung als geeignet heraus (Abb. 4.14B).

A



B Quantifizierung für 9R-524

Expression (T; IPTG)	Imidazol (M)		Banden-V.	Summe (B+E)	% Eluat
30°C; 0,1 mM	0,35	Beads	337.494	466.753	27,7
		Eluat	129.259		
30°C; 0,2 mM	0,5	Beads	332.565	547.216	39,2
		Eluat	214.651		
37°C; 0,1 mM	0,75	Beads	296.369	495.388	40,2
		Eluat	199.019		
37°C; 0,2 mM	1,0	Beads	313.112	494.146	36,6
		Eluat	181.034		

Abb. 4.14) Die Expression bei 30°C erhöht drastische die 9R-524 Peptidausbeute, durch Änderungen der Expressions- und Eluierungsparameter sind weitere Steigerungen möglich

A) Die Coomassie-Färbung zeigt das wie zuvor (Abb. 4.13) mit Ni-NTA-Agarose aufgereinigte His-9R-524 Peptid, zum Einen noch an Beads (B) gebunden, vor und nach der Elution (v. bzw. n.E.) und zum Anderen die Eluate (E). Es ist eine 20-fache Steigerung bei der 30°C Expression üN verglichen zu 16°C üN densitometrisch ermittelt wurden (linkes Gel, erste beiden Spuren). Die Quantifizierung der 9R-524 Bande mit Hilfe eines BSA Standards (1-3 µg) ergibt in den ersten beiden Eluat (350 mM Imidazol, Elutionspuffer:Beadsvolumen = 1:1) knapp 2 µg und durchschnittlich 0,095 µg/µl His-9R-524 Peptid. Für die PAGE wurden jeweils 20 µl Überstand bzw. Beads mit SDS-Ladepuffer aufgekocht und auf das Gel geladen. Die Spuren im linken Panel stammen von demselben SDS-Gel.

B) Es wurden 30°C und 37°C (jeweils üN) mit entweder 0,1 oder 0,2 mM IPTG für die Expression getestet. Die Eluierungseffizienz wurde im Bereich von 0,35 bis 1 M Imidazol überprüft. Die densitometrisch quantifizierten Coomassie-Banden (nicht gezeigt) ergaben ein Optimum für die Expression von PAB-CoR 9R-524 bei 30°C und 0,2 mM IPTG und für die Eluierung eine Imidazolkonzentration von 750 mM.

Es konnte eine 1,5-fache Steigerung der Eluierungseffizienz von 28 auf 40 % durch die ca. doppelte Imidazolkonzentration erreicht werden, während die zweifache IPTG-Menge, ebenso wie der Unterschied von 7°C nur geringfügig die Expression erhöhen. Für 9R-513 sind dieselben Expressions- sowie Isolierungsbedingungen optimal, dennoch ist der Peptidgewinn sechsfach niedriger aufgrund einer geringeren Expressions- bzw. Aufreinigungseffizienz. Außerdem weist 9R-513 die geringste Eluierungseffizienz unter den Peptiden mit nur 30 % auf (nicht gezeigt), was auf eine sehr hohe Affinität zum Säulenmaterial schließen lässt. Für 9R sind währenddessen 30°C; 0,1 mM IPTG sowie 1 M Imidazol günstig. Die Peptidausbeute ist ähnlich wie für 9R-13 und somit ebenfalls wesentlich schwächer verglichen zu 9R-524.

Insgesamt konnte die Ausbeute von 9R-524 mittels His-Tag und Ni-NTA-Agarose Aufreinigung um das rund Zehnfache gesteigert werden im Vergleich zur Aufreinigung als GST-Fusion (Abb. 4.15). So konnte nach Abspaltung von GST durch Thrombin 9R-524 mit einer Ausbeute von 570 µg/l Bakterienkultur isoliert werden (links), wobei über den His-Tag und der entsprechenden Ni-NTA-Agarose eine wesentlich größere Peptidmenge erreicht

wurde (rechts). Trotz ineffizienter Eluierung von 40 % ist diese mit 6 mg/l Kultur zehnfach höher.

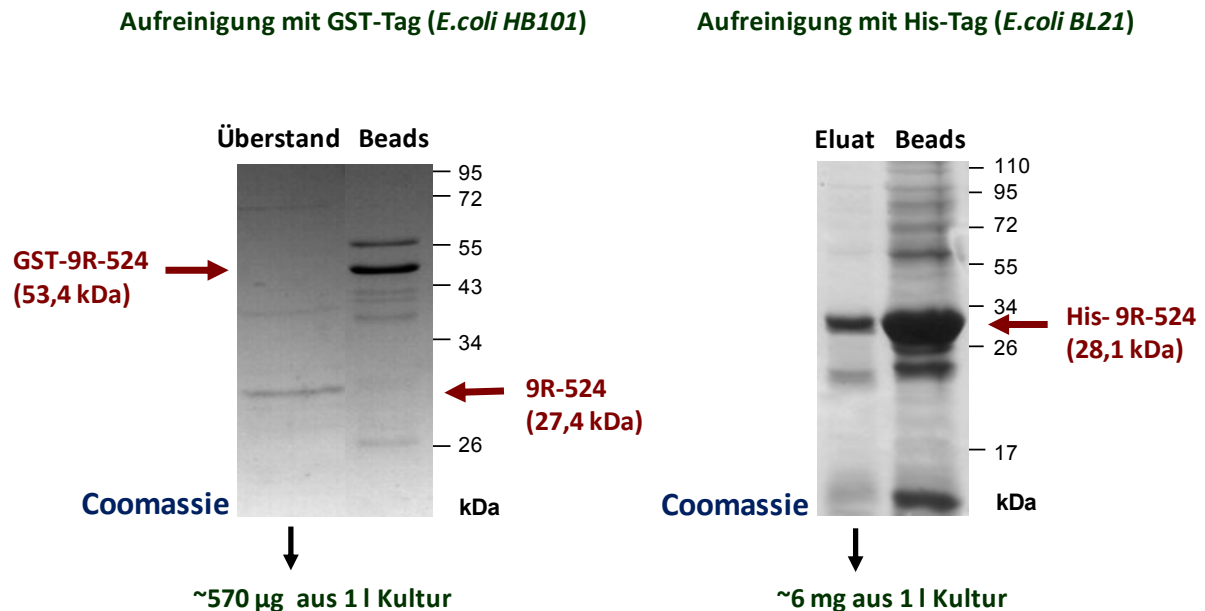


Abb. 4.15) Mittels His-Tag und der Aufreinigung über Ni-NTA-Agarose konnte zehnfach mehr 9R-524 gewonnen werden im Vergleich zur Aufreinigung über die GST-Fusion

Die Coomassie-gefärbten Gele zeigen das affinitätsaufgereinigte 9R-524 Peptid, links in *E. coli* HB101 exprimiert und isoliert mittels GST-Fusion über Glutathion Sepharose. Dazu wurde der *E. coli* Extrakt für das 53,4 kDa große GST-9R-524 (100 µl) mit 20 µl Glutathion Sepharose aufgereinigt, wobei der Überstand das von GST abgespaltene 9R-524 Peptid (27,4 kDa) enthält. Die Beads wurden nach der Spaltung aufgetragen. Rechts wurde das His-fusionierte Peptid (28,1 kDa) in *E. coli* BL21 exprimiert und über Ni-NTA-Agarose aufgereinigt (wie in Abb. 4.13). Gezeigt sind das erste Eluat und die Beads nach Eluierung. Die Eluierungseffizienz beträgt dabei ca. 40 %. Für die PAGE wurden jeweils 20 µl Beads und Überstand bzw. Eluat mit SDS-Ladepuffer aufgekocht und auf das Gel geladen. Unten sind die mittels BSA (nicht gezeigt) quantifizierten Peptidmengen je l Bakterienkultur angegeben. Die Spuren links stammen vom selben SDS-Gel.

4.2.5) Aufbereitung der PAB-CoR-Peptide für die funktionellen Analysen in Zellkultur

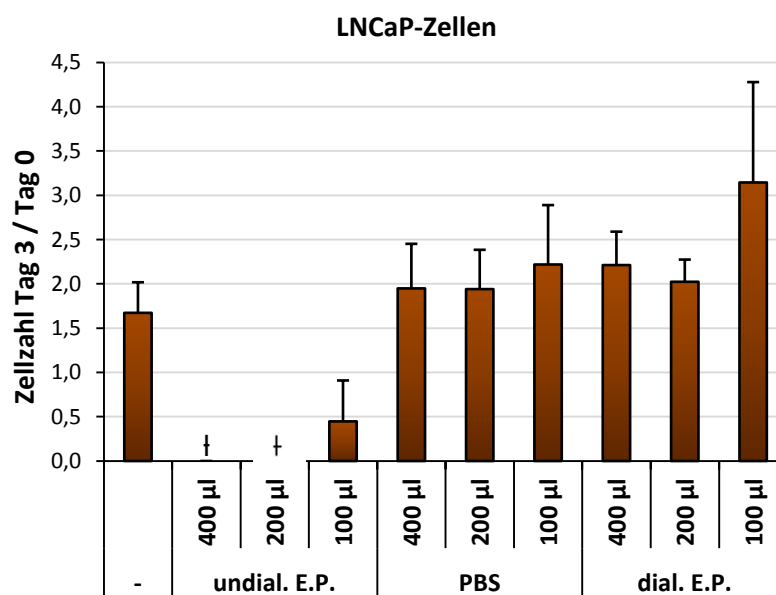
Da Imidazol eine mäßige Toxizität aufweist mit einem LD₅₀-Wert von 220 mg/kg Körpergewicht Ratte, sollte die Verträglichkeit in LNCaP-Zellen konzentrationsabhängig bestimmt werden. So ist der Elutionspuffer mit 1 M Imidazol in einem Anteil im Medium von 20 % bis 40 % vollständig letal für die LNCaP-Zellen, bei 10 % konnten wenige Zellen, rund 20 %, überleben (Abb. 4.16A). Nach Entfernung des Imidazols durch Dialyse mittels eines Zellulose-Schlauchs mit einer Ausschlussgrenze von 14 kDa gegen PBS (pH 8.0) in einem 20-fachen Volumen des Eluats bewirkt der Elutionspuffer nach drei Tagen kein vermindertes Wachstum mehr. 60 % des Peptids konnten nach der Dialyse erhalten werden (Abb. 4.16B).

Der dialysierte Elutionspuffer ist ebenfalls im Langzeitversuch bis zu einem Anteil von 30 % nicht toxisch für LNCaP-Zellen (Abb. 4.16C), was einer 9R-524 Peptidkonzentration von $0,72 \mu\text{M}$ entspricht, während 40 % Endkonzentration eine leichte proliferationshemmende Wirkung zeigen. Ausgehend von dieser Konzentration können ungefähr $0,9 \mu\text{M}$ dialysiertes 9R-524 Peptid eingesetzt werden. Als Vergleich konnte zuvor mit $0,3 \mu\text{M}$ GST-aufgereinigten Peptid bereits eine zweifache Wachstumshemmung erreicht werden (Reeb und Gerlach *et al.*, 2011).

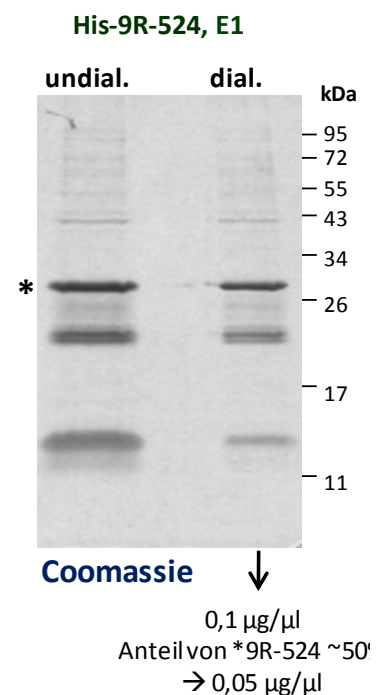
Als Alternative zur Imidazolentfernung mittels Dialyse wurde die Ultrafiltration getestet, welche schneller ist und somit Proteinabbau vermeiden und gleichzeitig zur Konzentrierung der Peptide führen sollte. Allerdings stellte sich diese Methode als ungeeignet heraus, aus der Polyethersulfone-Membran konnte nur ein geringer Anteil regeneriert werden (nicht gezeigt). Die Imidazol-freie Isolierung der Peptide mittels Abspaltung durch die TEV-Protease erzielte ebenfalls geringe Ausbeuten (nicht gezeigt).

A

Wenn 9R-524 = $0,057 \mu\text{g/ml}$ (40% von $0,095 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ aus Abb. 4.14A)
 $400 \mu\text{l} = 0,96 \mu\text{M}$
 $200 \mu\text{l} = 0,48 \mu\text{M}$
 $100 \mu\text{l} = 0,24 \mu\text{M}$



B



C

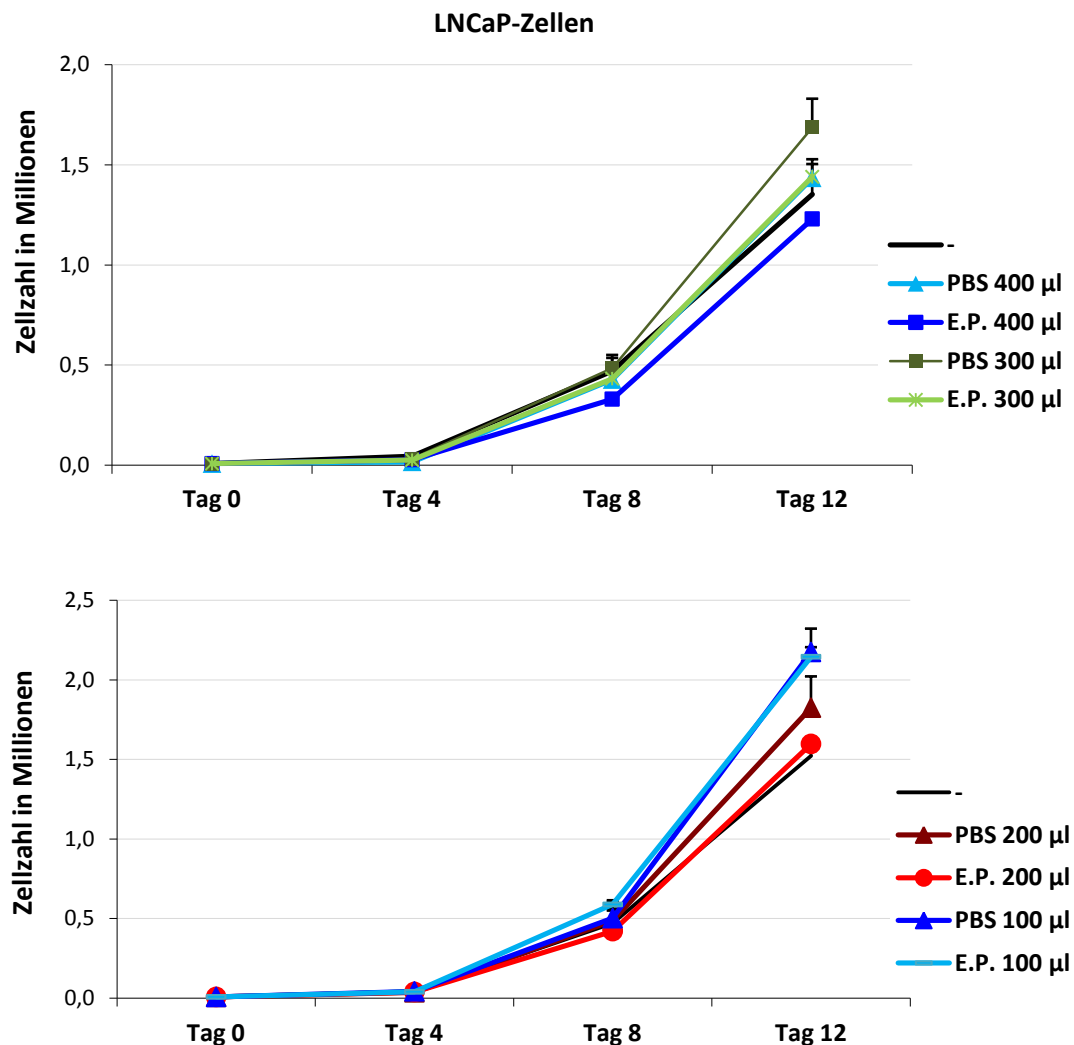


Abb. 4.16) Die Dialyse reduziert deutlich die Zytotoxizität des Elutionspuffers

A) Das relative Wachstum der LNCaP-Zellen gibt den fachen Unterschied der Zellanzahl am Tag 3 geteilt durch Tag 0 an. 9.000 LNCaP-Zellen wurden in 12- Wells ausgesät und 48 h später für 72 h mit 100 bis 400 µl des gegen PBS dialysierten (dial. E.P.) sowie unbehandelten Elutionspuffers (undial. E.P.) in 1 ml Zellkulturmedium behandelt. Über dem Diagramm befinden sich die potenziellen 9R-524 Peptidkonzentrationen bei den entsprechenden Volumina an Elutionspuffer. PBS diente als Kontrolle und „t“ bedeutet, dass keine lebenden Zellen mehr vorhanden waren. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung vom Mittelwert einer Vierfachbestimmung an.

B) Die Coomassie-Färbung zeigt das Eluat (E) 1 von His-9R-524. Die Aufreinigung erfolgte wie in Abb. 4.13. Nach der Dialyse ist ein Verlust der entsprechenden Bandenintensität um 40 % zu verzeichnen. Die photometrische Konzentrationsmessung ergab 0,1 µg/µl im Gesamteluat, wobei nach densitometrischer Quantifizierung das His-9R-524 Peptid einen Anteil von 50 % hat.

C) Das absolute Wachstum der LNCaP-Zellen gibt die Zellanzahl in Millionen am Tag 0, 4, 8 und 12 an. 9.000 LNCaP-Zellen wurden in 12- Wells ausgesät und 48 h später mit 300-400 µl (oben) bzw. 100-200 µl (unten) dialysiertem Elutionspuffer (E.P.) oder PBS pro ml Medium am Tag 0, 2, 4, 6 und 8 behandelt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung vom Mittelwert einer Vierfachbestimmung an.

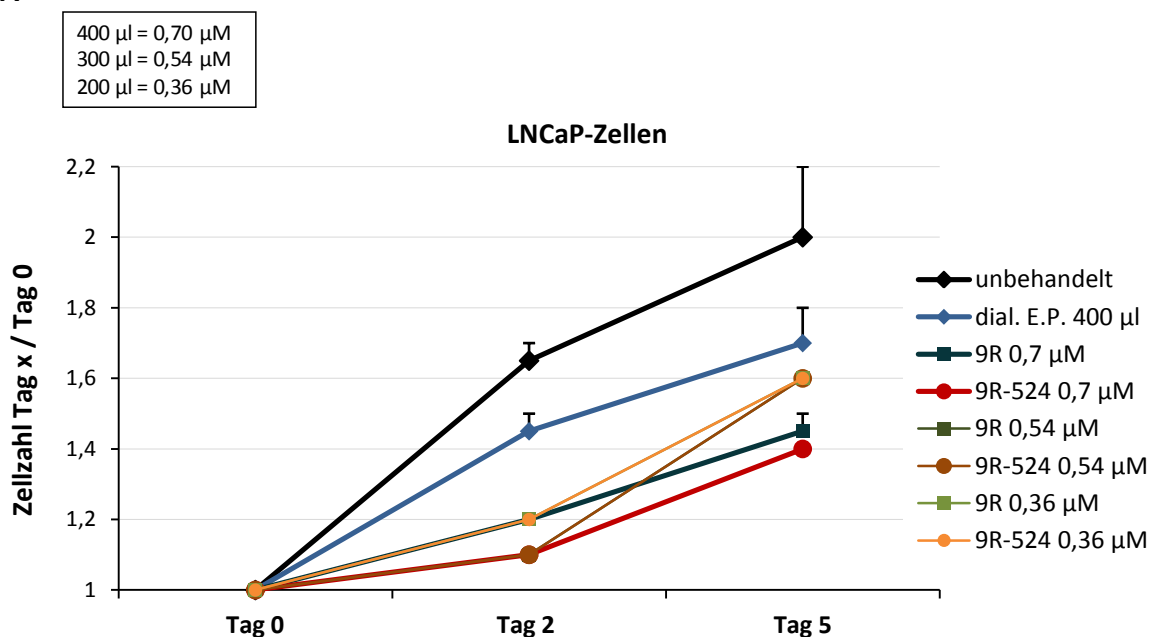
Die Gesamtausbeute nach Dialyse beträgt 330 µg 9R-524 Peptid in 5,9 ml Eluat (ca. 0,05 µg/µl) aus einer Bakterienkultur von 100 ml, was 3,3 mg pro l Bakterienkultur entspricht. Dieser Ertrag spiegelt den Verlust des Peptids, was zuvor mit 6 mg/l isoliert werden konnte (Abb. 4.15), während der Dialyse um etwa 40 % wider. So ist die Gesamtausbeute gegenüber der GST-vermittelten Aufreinigung dennoch ca. fünffach gesteigert.

Somit konnte nun die Behandlung der LNCaP-Zellen mit den His-fusionierten PAB-CoR-Peptiden erfolgen. Zum Abgleich der Mengen wurden die dialysierten Eluate aller drei Peptide auf ein Gel aufgetragen (nicht gezeigt). Wie zuvor erwähnt (Kapitel 4.2.4), ist die Proteinausbeute von 9R-513 geringer verglichen zu 9R-524.

Die Behandlung der LNCaP-Zellen über acht Tage (an den Tagen 0, 2, 4 und 6) ergibt eine signifikante Proliferationshemmung durch 0,7 µM 9R-524 sowie 9R-513, was 400 µl dialysiertem Eluat/ml Medium entspricht (Abb. 4.17A, gezeigt am Beispiel von 9R-524). Allerdings hat die Negativkontrolle 9R einen ähnlichen Effekt. Bei 0,36 und 0,54 µM (200 und 300 µl Eluat/ml Medium) sind jeweils keine signifikanten Effekte mehr vorhanden.

Untersucht wurde auch der Einfluss auf die Menge des Zielmoleküls AR, welche von den Peptiden 9R-524 und 9R-513 im Bereich von 0,36 - 0,7 µM im Gegensatz zu 9R effizient vermindert wird (Abb. 4.17B). Somit scheinen beide Peptide den AR PA-spezifisch zu reduzieren, was der unspezifischen Inhibierung des Wachstums gegenüber steht.

A



B

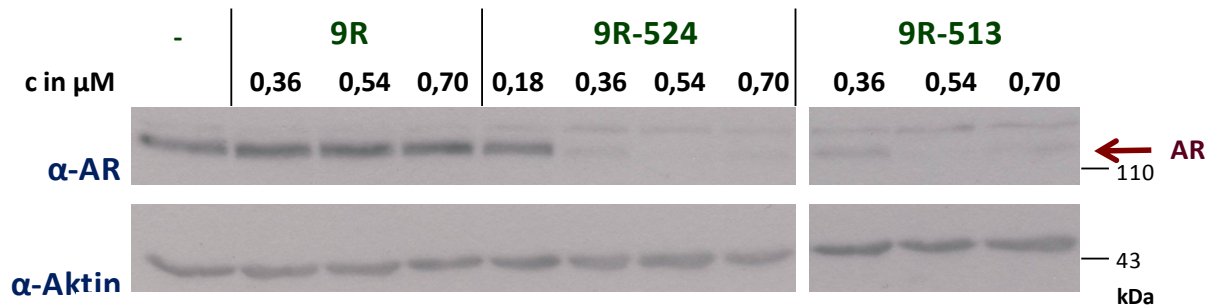


Abb. 4.17) In LNCaP-Zellen reduzieren 0,36 bis 0,7 μ M 9R-524 sowie -513 das AR-Proteinniveau PA-spezifisch, jedoch wird die Proliferation gleichermaßen auch vom Kontrollpeptid 9R gehemmt

A) Das relative Wachstum der LNCaP-Zellen gibt den fachen Unterschied der Zellanzahl am Tag 3 und 5 geteilt durch Tag 0 an. 9.000 LNCaP-Zellen wurden in 12-Wells ausgesät und 48 h später an den Tagen 0, 2 und 4 mit 9R-524 in den Konzentrationen 0,36, 0,54 und 0,7 μ M, was 200 – 400 μ l dialysiertem Eluat in 1 ml Medium entspricht, behandelt. Über dem Diagramm befinden sich die Volumina an Elutionspuffer bei den entsprechenden 9R-524 Peptidkonzentrationen. 9R sowie dialysierter Elutionspuffer (dial.E.P.) dienen als Negativkontrolle. Für 9R-13 ist das Ergebnis ähnlich (nicht gezeigt). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung vom Mittelwert einer Vierfachbestimmung an.

B) Westernblot-Analysen gegen AR (α-AR) und Aktin (α-Aktin), zur Normalisierung, wurden nach PAB-CoR Behandlung in LNCaP-Zellen durchgeführt. Dazu wurden 300.000 LNCaP-Zellen in 6-Wells ausgesät und 24 h später mit den Peptiden für vier Tage (an Tag 0 und 2) in den Konzentrationen 0,18 – 0,7 μ M behandelt. Alle Spuren stammen vom selben SDS-Gel.

Die Hemmung der Proliferation könnte auf einer generellen zytotoxischen Wirkung beruhen, welche u. a. durch proteingebundenes Imidazol oder Proteinpräzipitate, welche nicht sichtbar sind, verursacht werden. Im Allgemeinen könnte so die eingesetzte, aber notwendige Menge an 9R-fusionierten Proteinen zu hoch sein. Dies könnte möglicherweise durch eine effizientere Proteintransduktion vermieden werden, so dass eine geringere Proteinkonzentration ausreicht, um vorwiegend spezifische Effekte zu erzielen. Zur Erhöhung der Transduktionseffizienz wurde die PTD TAT verwendet, welche in letzter Zeit gehäufiger als 9R zu erfolgreichen Anwendungen, auch *in vivo* führte (Heitz *et al.*, 2009; Patel *et al.*, 2007). Die AS-Sequenzen der TAT-Fusionspeptide sind in Kapitel 8.2 dargestellt.

4.2.6) Optimierung der Aufreinigungs- und Dialysebedingungen nach Austausch der PTD 9R durch TAT

Die Expressions- bzw. Aufreinigungseffizienz von TAT-524 ist ähnlich der von 9R-524 mit einer Gesamtproteinmenge von 7,6 μ g (Beads + Eluat) und damit ca. doppelt so hoch verglichen zu TAT und TAT-513 (Abb. 4.18). Dieser Unterschied zwischen den TAT-524 und TAT bzw. TAT-513 Mengen konnte bereits bei den 9R-Fusionen beobachtet werden (Kapitel 4.2.4). Hingegen ist die Eluierungseffizienz von TAT-524 (9 %) wesentlich geringer als bei 9R-

524 (32 %), jedoch können TAT und TAT-513 jeweils besser eluiert werden (31 % bzw. 20 %). So konnte schließlich im verwendbaren Überstand für 9R-524 mit 2,5 µg aus 0,5 ml Kultur, was der zuvor ermittelten Ausbeute von 6 mg/l (Abb. 4.15) entspricht, die größte Proteinmenge isoliert werden. Geringere Ausbeuten erzielen TAT mit 1,3 µg, gefolgt von TAT-524 bzw. -513 mit jeweils 0,7 µg Peptid aus 0,5 ml Kultur (Abb. 4.18, Bachelorarbeit K. Schärlich, 2012).

Die Expressionsbedingungen 30°C und 0,1 mM IPTG sind für TAT-524 sowie TAT-513 günstig, während TAT mit 0,2 mM IPTG besser exprimiert wird. 37°C sind somit, genau wie für die 9R-Fusionen (Abb. 4.14), ungeeignet. Des Weiteren sind für die Eluierung von TAT-524 sowie TAT 0,75 M und für TAT-513 1,0 M Imidazol vorteilhaft (Bachelorarbeit K. Schärlich, 2012).

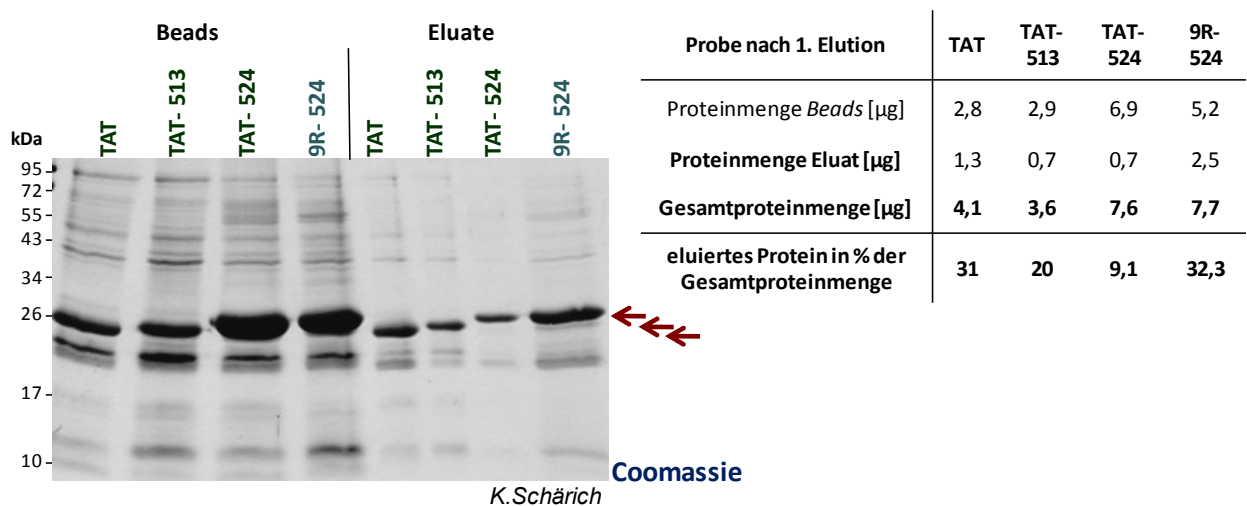


Abb. 4.18) Die Gesamtausbeute des Peptids TAT-524 ist ähnlich der von 9R-524, im verwendbaren Überstand ist jedoch aufgrund geringer Eluierung ca. vierfach weniger vorhanden

Die Coomassie-Färbung links zeigt die Affinitätsaufreinigung der His-fusionierten Peptide TAT (untere Pfeil), TAT-513 (mittlere Pfeil) und TAT-524 sowie 9R-524 (jeweils obere Pfeil). Es sind die an Beads gekoppelten und die im ersten Eluat (nicht dialysiert) gelösten Peptide dargestellt. Die Proteine wurden nach den ermittelten optimalen Bedingungen exprimiert und isoliert. Es wurden 40 µl Bakterienextrakt an 10 µl Ni-NTA-Agarose gebunden. Rechts sind die mittels des quantifizierten 9R-524 Eluats (Abb. 4.14A) errechneten Peptidmengen dargestellt. Die Analyse wurde von K. Schärlich (Bachelorarbeit, 2012) durchgeführt.

Entgegen der rund vierfach schwächeren Ausbeute im undialysierten Eluat von TAT-524 gegenüber 9R-524 können jedoch die TAT-Fusionspeptide nach der Dialyse in wesentlich größerer Menge als die 9R-Fusionen gewonnen werden (Abb. 4.19A). Allerdings präzipitierten die TAT-Proteine während der Dialyse gegen PBS vollständig. Nach der

Zentrifugation konnten keine gelösten Proteine im Überstand mehr nachgewiesen werden (Abb. 4.19B). Nur bei 9R blieb ein geringer Teil in Lösung.

Ohne Zweifel ist jedoch nach der Dialyse in den Peptidsuspensionen eine deutlich höhere Ausbeute der TAT-Fusionen im Vergleich zur den 9R-Fusionen, ca. zweifach bei TAT und siebenfach bei TAT-524, erkennbar. Außerdem ist nach Dialyse die Proteinmenge von TAT-524 im Vergleich zu TAT und TAT-513 zwei- bzw. dreifach größer. Ein ähnlicher Unterschied wurde auch bei den 9R-Fusionen festgestellt (nicht gezeigt). Dies könnte, neben einer stärkeren Proteinbiosynthese oder Bindung des Säulenmaterials, einer höheren Stabilität des gesamten Fusionsproteins infolge des PA 524 zugrunde liegen. Die Eluierungseffizienz spielt hingegen keine Rolle, da TAT-524, ebenso wie 9R-524 nicht besser eluiert werden kann (Abb. 4.18 bzw. Kapitel 4.2.4).

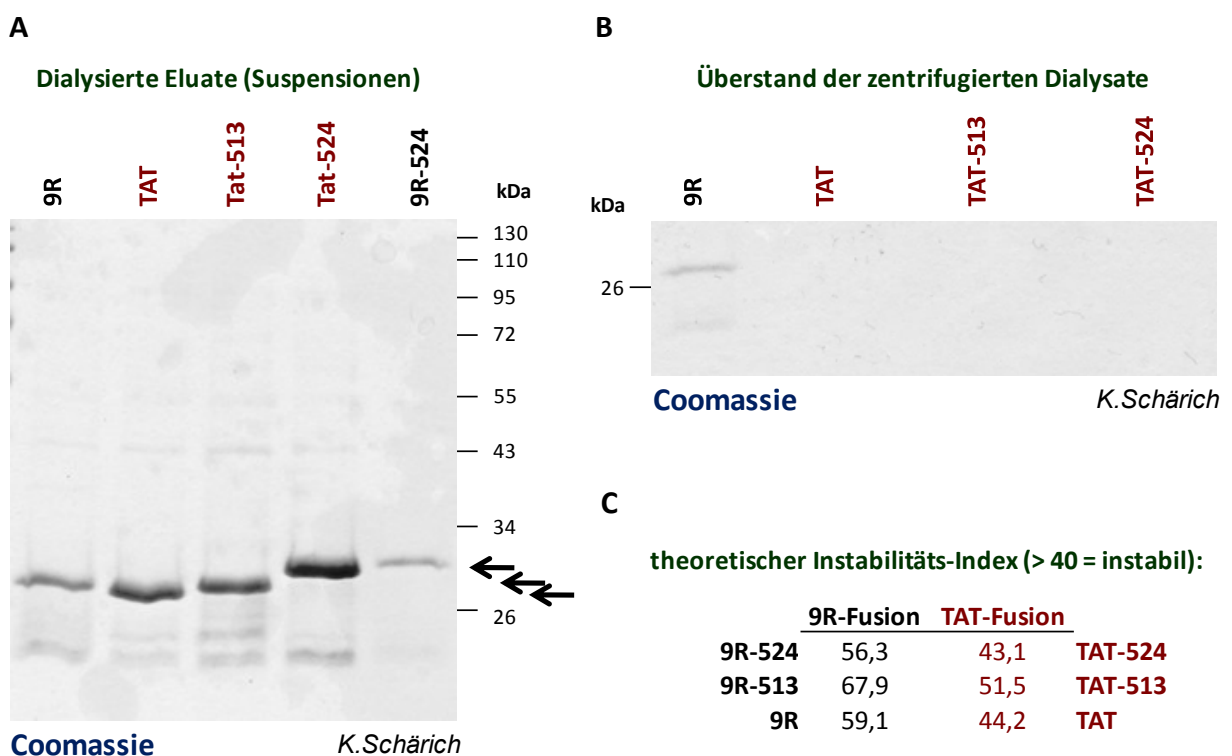


Abb. 4.19) Die TAT-Fusionspeptide können nach der Dialyse in wesentlich größerer Menge als die 9R-Fusionen gewonnen werden, jedoch kommt es zur Präzipitation

A) Die Coomassie-Färbung zeigt die dialysierten Eluate, welche aufgrund von Proteinpräzipitation Suspensionen sind. Die Aufreinigung erfolgte wie in Abb. 4.13.

B) Die Coomassie-Färbung zeigt die Überstände nach Zentrifugation der dialysierten Eluate für 10 min bei 15.000 rpm und 4 °C.

C) Theoretischer Instabilitätsindex mittels ExPASy/ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam>). Ein Wert von über 40 sagt dabei instabile Proteine voraus.

Die Ergebnisse stammen aus der Bachelorarbeit von K. Schärlich (2012).

So wurde ein theoretischer Instabilitätsindex mittels Expasy/Protparam berechnet (Abb. 4.19C), welcher auf dem Einfluss spezifischer Dipeptide auf eine gegebene AS-Sequenz (Guruprasad *et al.*, 1990) beruht. Dieser Wert ist deutlich niedriger für die TAT-Fusionen, verglichen zu den 9R-Fusionen, und erreicht beinahe die Grenze zu theoretisch stabilen Proteinen (Index > 40). Trotzdem gelten die Peptide immer noch als instabil (Bachelorarbeit K. Schärlich, 2012). Der bessere Stabilitätswert für TAT-524 und TAT gegenüber TAT-513 und generell verglichen zu den 9R-Peptiden spiegelt sich in der Proteinmenge nach der Dialyse wider (Abb. 4.19A). Außerdem liegt die geschätzte Halbwertszeit (Expasy/Protparam) in Säugerzellen für alle TAT-Fusionspeptide und auch für das 9R Kontrollpeptid bei 30 h, während für 9R-524 bzw. -513 nur 3,5 h kalkuliert wurden (nicht gezeigt).

Aufgrund der Proteinpräzipitation während der Dialyse sollten als nächstes weitere Dialysepuffer getestet werden, welche eventuell besser geeignet sind, um die Proteinlöslichkeit und somit –Funktionalität zu erhalten. Salze und andere Additive im Lösungsmittel können einen großen Einfluss auf die Proteinstabilität haben, indem sie die Ionenstärke, den pH, die Hydrathülle sowie die Interaktion mit bestimmten chemischen Gruppen auf der Proteinoberfläche beeinflussen (Scharnagl *et al.*, 2005). Die meisten getesteten Dialysepuffer (DP) (Abb. 4.20A) haben eine Natriumphosphat-Basis mit verschiedenen Molaritäten, einige auch TRIS und Hepes, ohne oder mit verschiedenen Konzentrationen von NaCl oder anderen Salzen. Eine höhere Salzkonzentration könnte das während der Dialyse verschwindende Imidazol ersetzen, welches möglicherweise die Aggregation von Histidinresten kompetitiv verhindert (Hamilton *et al.*, 2003). Der Zusatz von DTT sollte die Oxidation von Thiolgruppen unterbinden, während ZnCl₂ mögliche Zinkfinger stabilisiert. Die Eluierungseffizienz kann allerdings durch einen Zusatz von 1 mM DTT bzw. 10 µM ZnCl₂ nicht verbessert werden (Bachelorarbeit K. Schärlich, 2012).

In allen DP kam es während der Dialyse mehr oder weniger zur Proteinausfällung, in den zentrifugierten Proben wird jedoch aufgrund der unterschiedlichen Proteinmengen deutlich, dass die Zusammensetzung eine große Rolle für die Löslichkeit der Proteine spielt (Abb. 4.20B). Im Vergleich zu PBS wurde eine wesentliche Verbesserung der Ausbeute erzielt, für TAT-524 eignet sich vor allem DP 3, 4, 5, 9 und in geringerem Maß auch DP 2 und 6. Für TAT ist besonders DP 4, 6, 9 und 10 hilfreich.

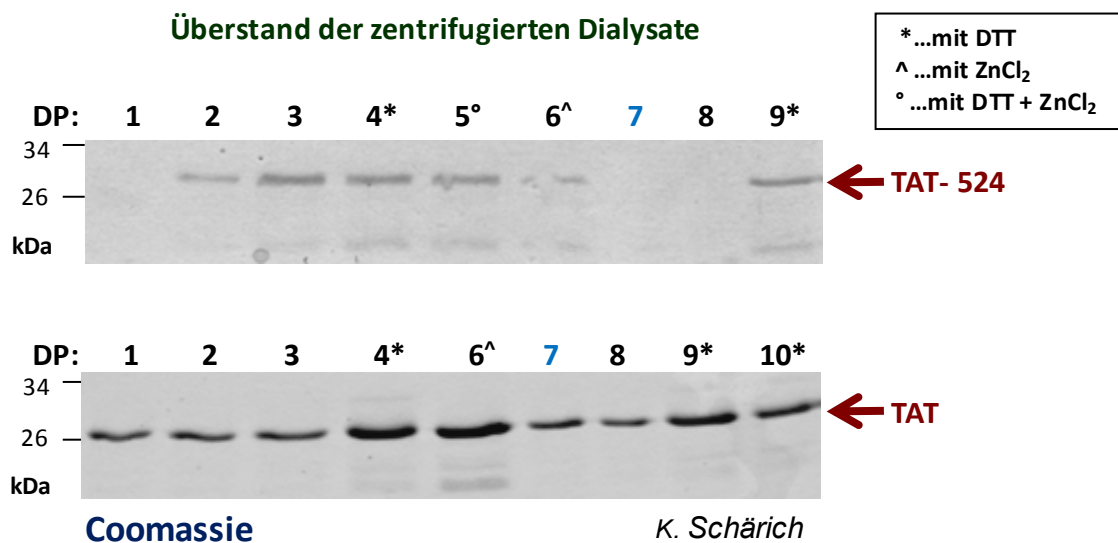
Auffällig ist, dass, entgegen der höheren TAT-524 Menge in den dialysierten Suspensionen verglichen zu TAT und TAT-513 (s. 4.19A), bei den gelösten Peptiden TAT gegenüber TAT-524

deutlich überwiegt (Abb. 4.20B). Letztendlich wurde die Löslichkeit und somit der Ertrag an einsetzbarem Peptid TAT-524 maßgeblich durch die Verwendung einer hohen NaCl Konzentration (DP 3) erhöht, der Zusatz von DTT (DP 4) oder ZnCl₂ (DP 5) bringt bei diesen Bedingungen keine weitere Steigerung der Ausbeute. DTT verringert sogar etwas die Ausbeute an löslichem TAT-524. Der Austausch des Natriumphosphat-Puffers durch TRIS ist gleichermaßen wie die Erhöhung der Salzkonzentration von Vorteil (DP 9).

A

DP	Zusammensetzung, alle Puffer mit pH 8.0 und 7 % Glycerin
1	25 mM Natriumphosphat
2	25 mM Natriumphosphat, 0,25 M NaCl
3	50 mM Natriumphosphat, 0,5 M NaCl
4	50 mM Natriumphosphat, 0,5 M NaCl, 1 mM DTT
5	50 mM Natriumphosphat, 0,5 M NaCl, 1 mM DTT, 10 µM ZnCl ₂
6	50 mM Natriumphosphat, 0,5 M NaCl, 10 µM ZnCl ₂
7	1x PBS
8	20 mM TRIS
9	50 mM TRIS, 0,25 M NaCl, 1 mM DTT
10	20 mM HEPES, 60 mM KCl, 5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT

B



C

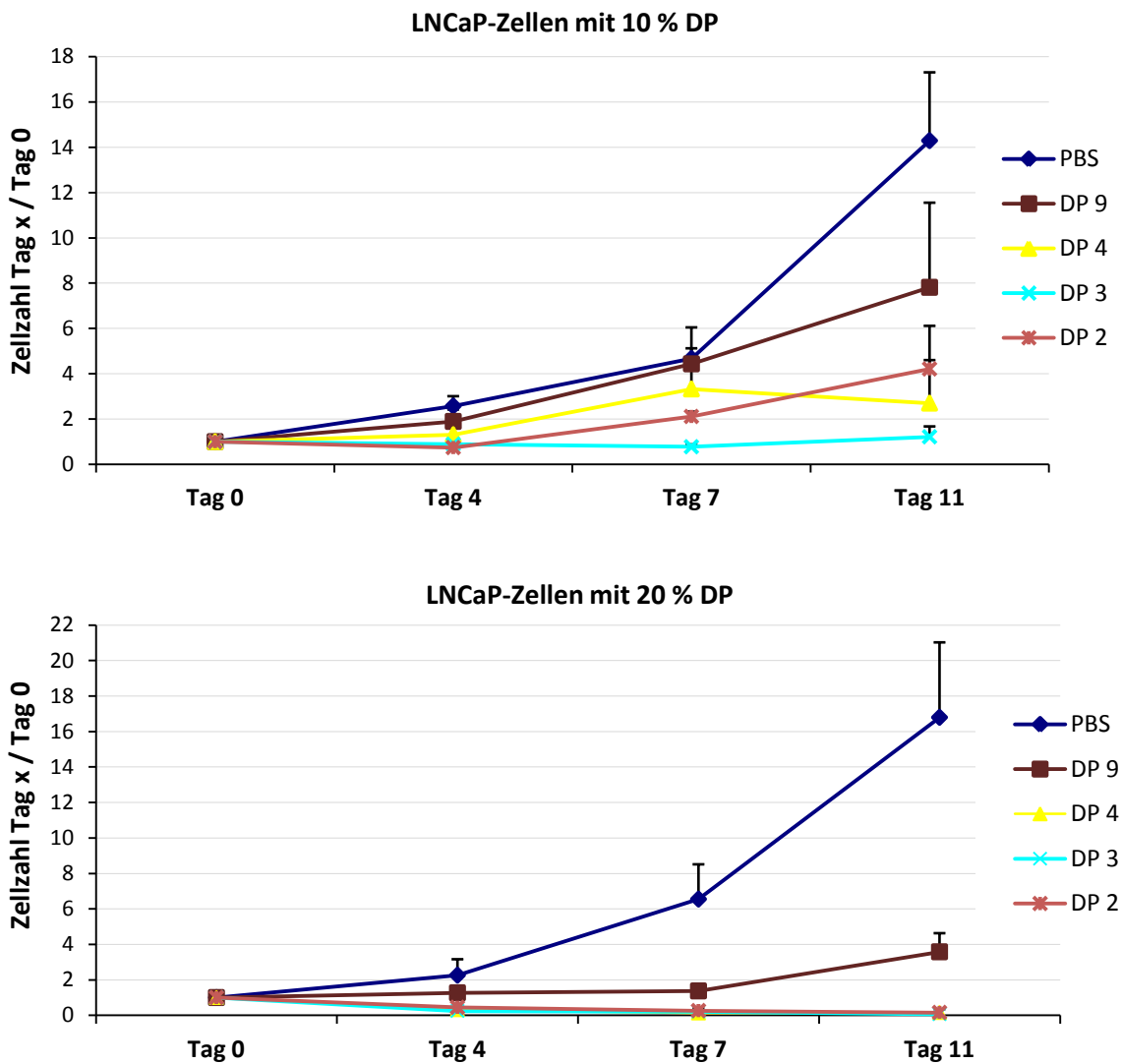


Abb. 4.20) Unter zehn getesteten Dialysepuffern zeigt DP 9 eine sehr gute Proteinlöslichkeit für die TAT-Peptide und die beste Verträglichkeit für LNCaP-Zellen

A) Die Tabelle zeigt die getesteten Dialysepuffer (DP) und deren Zusammensetzung. Der bisher verwendete Puffer PBS ist in blau dargestellt.

B) Die Coomassie-Färbung zeigt den Überstand der zentrifugierten (10 min bei 15.000 rpm und 4 °C) und gegen die verschiedenen Puffer dialysierten Eluate nach Ni-NTA Affinitätsaufreinigung (s. Abb. 4.13) der His-fusionierten Peptide TAT-524 und TAT.

C) Das relative Wachstum der LNCaP-Zellen gibt den fachen Unterschied der Zellanzahl am Tag 4, 7 und 11 geteilt durch Tag 0 an. 9.000 LNCaP-Zellen wurden in 12-Wellns ausgesät und 48 h später an den Tagen 0, 2, 6, 8 und 10 mit den ausgewählten DP in 10 bzw. 20 %iger Konzentration im Medium behandelt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung vom Mittelwert einer Vierfachbestimmung an.

Für TAT tritt hingegen eine wesentliche Verbesserung der Löslichkeit, vor allem durch den Zusatz von DTT (DP 4) und ZnCl (DP 6) ein, während die Erhöhung der Salzkonzentration nur geringfügige Effekte hat. Wie bei TAT-524 führt TRIS (DP 9) auch zu einer gesteigerten

Ausbeute. Allerdings kommt es in allen Fällen zur Proteinpräzipitation und somit zum Verlust an nativem Protein. Dennoch konnte durch die Optimierung der Expression, Aufreinigung, Eluierung und schließlich Dialyse die Ausbeute an TAT-Fusionspeptiden wesentlich verbessert werden, so dass sie in ausreichender Menge zur Analyse der Wirkung und Funktionsweise in PCa-Zellen hergestellt werden können.

Die vielversprechendsten DP unter Berücksichtigung minimaler Salzkonzentrationen und Zusätze, um eine gute Verträglichkeit in Zellen zu gewährleisten, sind DP 2, 3, 4 und 9. Denn bei diesen bestehen die höchsten Konzentrationen an gelöstem TAT-524. Im Wachstumsversuch wurde die Toleranz der LNCaP-Zellen gegenüber den ausgewählten DP getestet (Abb. 4.20C). In 20 %iger Konzentration sind fast alle zytotoxisch, lediglich DP 9 (50 mM TRIS, 0,25 M NaCl, 1 mM DTT) ist nicht vollständig letal, trotz starker Reduktion der Zellzahl. Mit nur 10 % Anteil im Medium hat DP 9 auch die geringsten Effekte, dennoch wird das Wachstum zweifach inhibiert. Somit kommt dieser als einzig geeigneter Dialysepuffer für die Anwendung in Zellkultur in Frage.

Die zweitniedrigste Zytotoxizität weist DP 2 (25 mM Natriumphosphat, 0,25 M NaCl) auf, gefolgt von den hochmolareren DP 3 und 4 (50 mM Natriumphosphat, 0,5 M NaCl), wobei der Zusatz von 1 mM DTT in DP 4 keine schädliche Wirkung zu haben scheint (vgl. DP 3).

Im Endeffekt ist mit dem für die Zellkultur geeigneten DP 9 eine partielle Löslichkeit für TAT-524 erzielt wurden, im zuvor verwendeten PBS kam es zur vollständigen Präzipitation. Weiterhin konnte die Löslichkeit für TAT verdoppelt werden (vgl. DP 7 zu 9).

4.2.7) Einfluss der TAT-fusionierten PAB-CoR-Peptide auf Wachstum, Apoptoserate, Zellzyklus und zelluläre Seneszenz

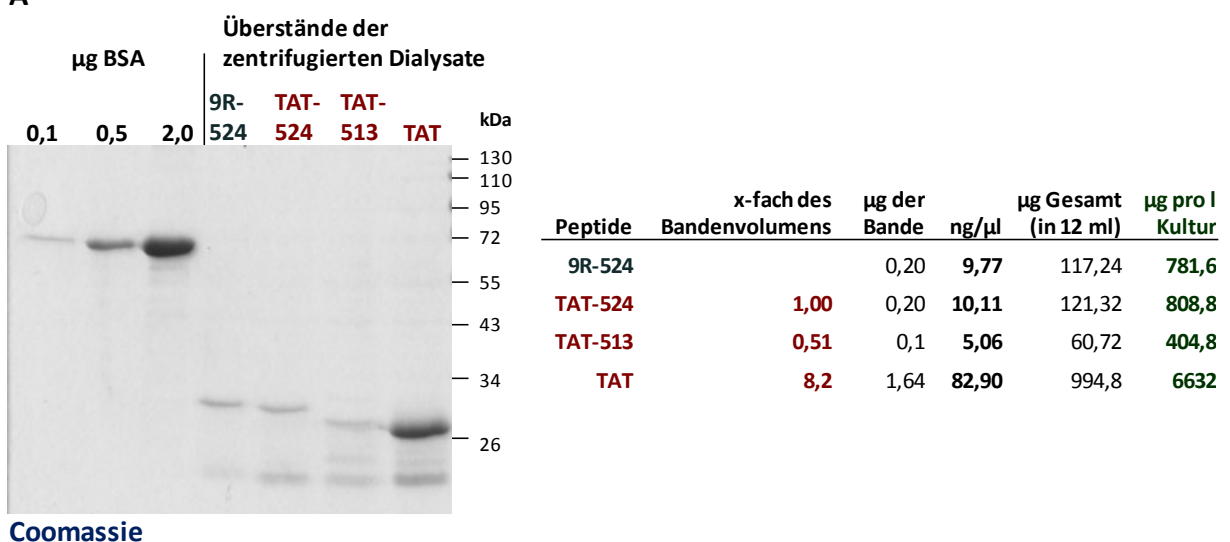
Zur Verwendung der TAT-fusionierten Peptide war vorerst eine Quantifizierung mittels BSA Standard und ein Abgleich der PAB-CoR-Peptid Mengen notwendig. Für TAT-524 konnte dabei eine ähnlich hohe Peptidausbeute in den zentrifugierten Dialysaten wie für 9R-524 erzielt werden (Abb. 4.21A), trotz des scheinbaren Vorteils von TAT-524 in Abb. 4.19. Dabei wurden allerdings Suspensionen, das heißt Präzipitat-haltige Proteinlösungen, verglichen. Wie zuvor (Abb. 4.20) ist auch hier TAT stärker vorhanden. Es konnte die rund achtfache Menge gegenüber TAT-524, dessen Ausbeute bei 809 µg je l Bakterienkultur mit einer Konzentration von 10,1 ng/µl liegt, isoliert werden. Verglichen dazu konnte für TAT-513 die halbe Proteinmenge mit 5,1 ng/µl bzw. 405 µg je l Kultur gewonnen werden.

Die isolierten und vom Imidazol befreiten PAB-CoR-Peptide sollten nun auf ihre Wirkung in den androgenabhängig wachsenden LNCaP-Zellen untersucht werden, wobei mit einem maximal einsetzbaren Volumen des dialysierten Elutionspuffers von 10 % -15 % (Abb. 4.20C) 37 bis 55 nM für TAT-524 und 18 bis 27 nM für TAT-513 getestet werden konnte. TAT wurde als Kontrolle jeweils entsprechend mit DP 9 verdünnt. Es wurden, wenn nicht anders angegeben, keine bereits aufgetauten Aliquots verwendet.

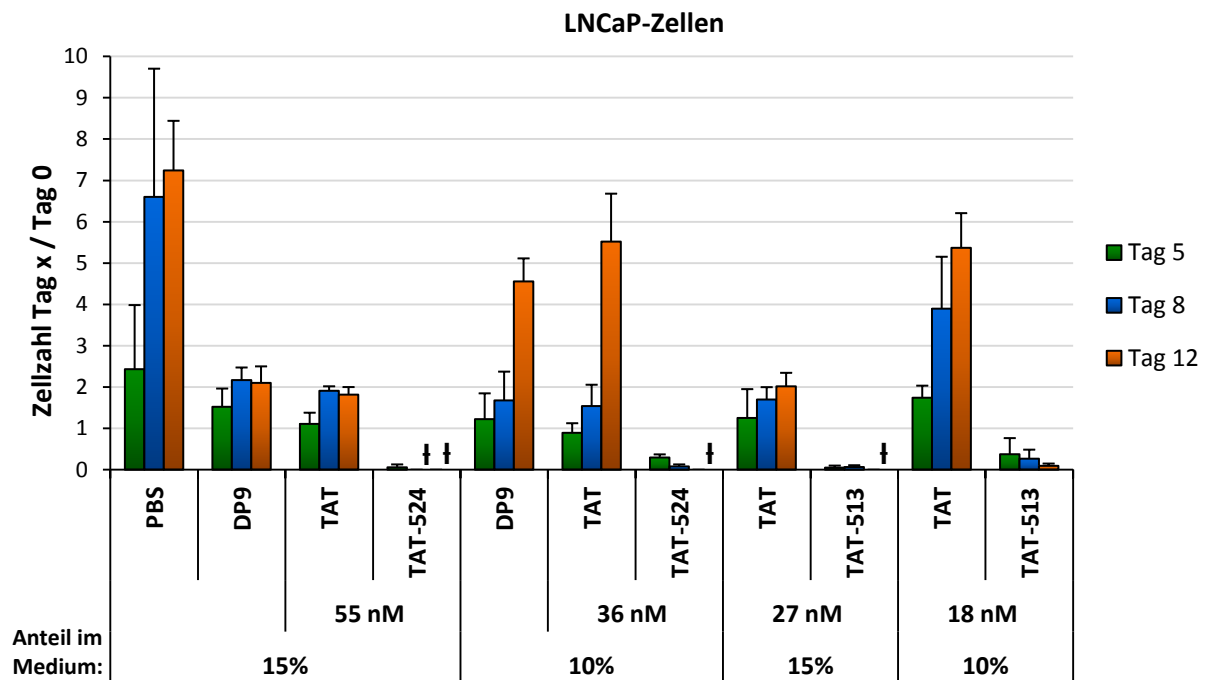
DP9 (50 mM TRIS, 0,25 M NaCl, 1 mM DTT) hat wie zuvor einen starken wachstumsinhibierenden bzw. zytotoxischen Effekt im Endvolumen von 15 % (Abb. 4.21B), was einer Peptidkonzentration von 55 nM bei TAT-524 bzw. einer Endkonzentration von 37,5 mM NaCl und 7,5 mM TRIS im Medium entspricht. Nach 12 Tagen ist die Zellzahl mit DP 9 lediglich verdoppelt gegenüber der siebenfachen Steigerung der Kontrolle mit PBS. Im Vergleich zu DP 9 hat 55 nM TAT keinen weiteren Einfluss, im Gegensatz zu TAT-524, welches die Zellen hundertprozentig eliminiert. In nur 10 %iger Konzentration wachsen die Zellen mit DP 9 und TAT besser (circa fünffach), während 36 nM TAT-524 langsamer, aber ebenfalls effizient zum vollständigen Absterben der Zellen führt.

Bei TAT-513 kann gegenüber TAT-524 aufgrund der geringeren Ausbeute nur die halbe Peptidmenge eingesetzt werden. Es hat sowohl mit 27 nM als auch mit 18 nM einen starken Zellzahl-reduzierenden Effekt, so dass es nach 12 Tagen wie bei TAT-524 zum vollständigen Absterben kommt. Nur bei 18 nM überlebt ein geringer Anteil der Zellen. Der Effekt durch TAT-513 wird bei 27 nM ebenfalls vorwiegend durch das Kontrollpeptid TAT, das heißt durch 15 % DP 9 verursacht. Hingegen besteht bei 18 nM TAT bzw. 10 % DP 9 kaum ein Einfluss.

A



B



C

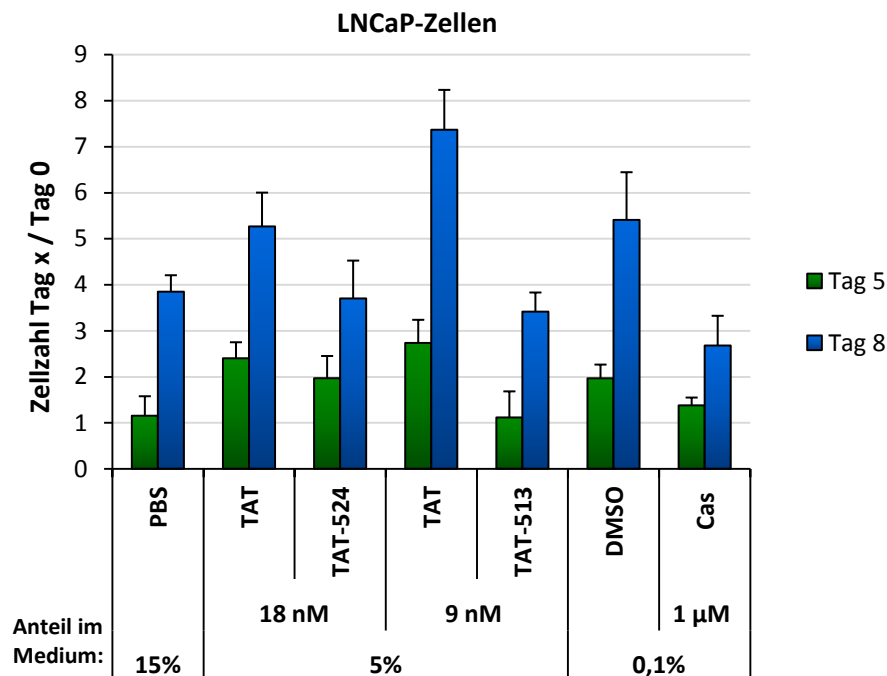


Abb. 4.21) Die TAT-fusionierten PAB-CoR-Peptide haben einen starken inhibitorischen Effekt auf das Wachstum der LNCaP-Zellen im nanomolaren Bereich

A) Anhand der Coomassie-Färbung (links) wurden die Peptidmengen mittels BSA densitometrisch quantifiziert und die Mengenunterschiede sowie die Ausbeute pro l Bakterienkultur berechnet (Tabelle, rechts). Die Isolierung erfolgte mit 6 ml Ni-NTA-Agarose und 24 ml Bakterienextrakt, wodurch 12 ml dialysiertes und zentrifugiertes Eluat entstanden. Dialysiert wurde gegen DP 9.

B) Das relative Wachstum der LNCaP-Zellen gibt den fachen Unterschied der Zellanzahl am Tag 5, 8 und 12 geteilt durch Tag 0 an. 9.000 LNCaP-Zellen wurden in 12-Wellns ausgesät und 48 h später an den Tagen 0, 3, 6 und 9 mit 36 und 55 nM TAT-524 bzw. 18 und 27 nM TAT-513 behandelt. Neben dem TAT Kontrollpeptid wurde auch 15 % PBS sowie der Puffer DP 9 als Lösungsmittelkontrolle in der jeweiligen Konzentration (in % unter der X-Achse) verwendet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung vom Mittelwert einer Vierfachbestimmung an. Das Zeichen „†“ bedeutet, dass die Zellen nach der Behandlungszeit abgestorben sind.

D) Wachstumsassay wie in C mit geringeren Konzentrationen: 18 nM TAT-524 und 9 nM TAT-513. Behandelt wurde am Tag 0, 3 und 6. Bei 9 nM TAT-513 und TAT wurde am Tag 6 bereits ein zuvor aufgetautes Aliquot verwendet.

Diese Experimente wurden nur einmal durchgeführt.

Anschließend wurden zweifach reduzierte PAB-CoR-Peptidkonzentrationen eingesetzt, wodurch der Anteil im Medium 5 % (v/v) ist (Abb. 4.21C). Die Peptide wirken nicht mehr letal, sondern haben eine leichte wachstumshemmende Wirkung. 18 nM TAT weist bei dem Volumenanteil von 5 % keine schädliche Wirkung mehr auf. 18 nM TAT-524 zeigt erst am Tag 8 einen sehr leichten Effekt (1,4-fach), der ausschließlich auf einer PA-spezifischen Wirkung beruht. 9 nM TAT-513 hingegen ist trotz Verwendung eines bereits wieder eingefrorenen Aliquots stärker, ebenso spezifisch und mit einer zweifachen Wachstumsinhibierung ähnlich effizient wie 1 μ M Cas, welches als Positivkontrolle der AR Inhibierung dient und als Antagonist in der PCa-Therapie eingesetzt wird.

Im Endeffekt wird die LNCaP-Zellzahl effizient durch die PAB-CoR-Peptide gehemmt, für TAT-524 in einer Konzentration bis 36 nM, während für TAT-513 18 nM ausreichend sind.

Als nächstes sollte der Mechanismus der effizienten Zellzahlreduktion aufgeklärt werden. Um einen möglichen Zellzyklusarrest zu detektieren bzw. Hinweise für eine Induktion von Apoptose zu erhalten, wurde in LNCaP-Zellen zuerst eine Zellzyklus-Analyse nach Behandlung mit 55 nM TAT-524 und 18 nM TAT-513 für 72 h durchgeführt (Abb. 4.22). Die LNCaP-Zellen haben bereits ohne Behandlung einen hohen G1-Anteil (76 %), da sie langsam wachsend sind. Serum-Entzug führt als Positivkontrolle für einen G1-Arrest zum weiteren Anstieg um 15 %. Nocodazol, welches die Depolymerisation der Mikrotubuli in der M-Phase hemmt, bewirkt währenddessen als Positivkontrolle für einen G2/M-Arrest eine knapp dreifache Zunahme der Zellen in dieser Phase.

55 nM TAT wirkt offensichtlich anti-apoptotisch. Die SubG1-Phase, welche Zellen mit weniger DNA enthält, was auf fragmentierte bzw. nach außen diffundierte DNA hindeutet und daher ein Indiz für die spätapoptotischen Zellen darstellt, ist dreifach vermindert. 55 nM TAT-524 führt hingegen zur 1,7-fachen Zunahme der Sub-G1 Population, jedoch ist diese

angedeutete Apoptose-Induktion, verglichen zur unbehandelten Kontrolle, nicht vorhanden. Weiterhin reduziert TAT-524 im Vergleich zu TAT den S-Phasen-Anteil von 10,6 % auf 3,5 % (dreifach) bei gleichzeitiger G1-Zunahme von 5 %. Insgesamt ergibt sich bezüglich der unbehandelten Kontrolle eine PA-vermittelte Halbierung der Zellen in der S-Phase sowie eine teils PA-unabhängige Erhöhung in der G1-Phase um 10,4 %.

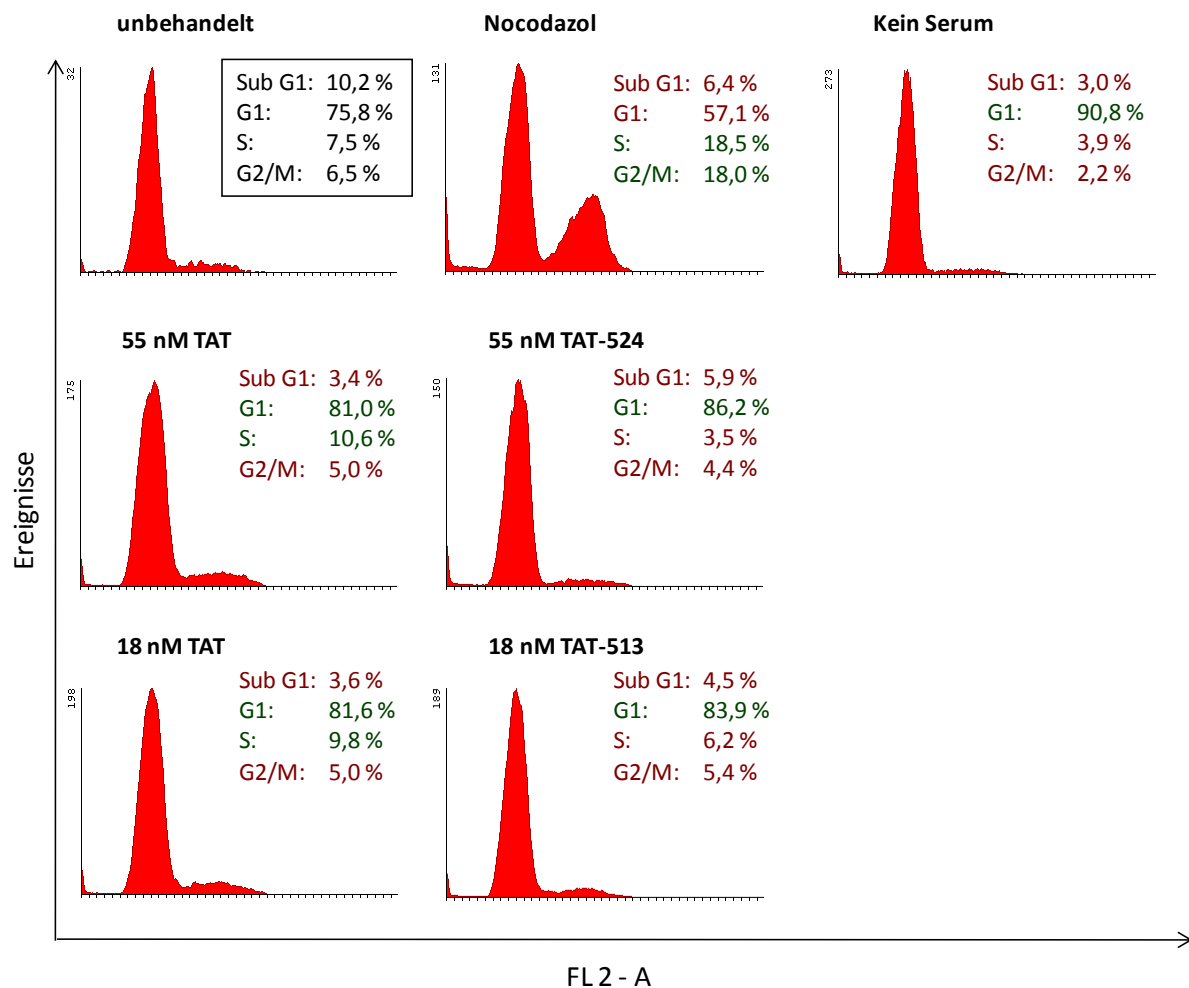


Abb. 4.22) In LNCaP-Zellen bewirken beide PAB-CoR-Peptide einen teils PA-abhängigen Anstieg der G1-Phase, wobei TAT-524 dies stärker vermittelt und zusätzlich die Zellen in der S-Phase PA-spezifisch vermindert

Die Fluoreszenzhistogramme zeigen den DNA-Gehalt der LNCaP-Zellen. 300.000 LNCaP-Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät und 24 h später für 72 h mit 55 nM TAT-524 oder 18 nM TAT-513 sowie dem entsprechend konzentrierten TAT-Peptid als Kontrolle behandelt. Serumentzug bzw. 2,5 µg/ml Nocodazol für 24 h dienten als Positivkontrolle für den G1 bzw. G2/M Arrest. Die Zellen wurden trypsinisiert, die Zellzahl per Neubauer-Zählkammer zum Einsetzen gleicher Mengen bestimmt. Anschließend wurden die Zellen mit Ethanol fixiert. Nach Färbung mit PI wurde anhand der FACS-Analyse die DNA-Menge gemessen und mit dem Programm Cylchred ausgewertet. Der Anteil der Zellen in der jeweiligen Zellzyklusphase ist in % angegeben. In rot sind die Verminderungen, in grün die Steigerungen gegenüber der unbehandelten Kontrolle dargestellt. Dieses Experiment wurde nur einmal durchgeführt.

18 nM TAT bewirkt wie die höhere Menge auch eine knapp dreifache Abnahme der Zellen in der SubG1-Phase und verstärkt somit die Hinweise auf eine anti-apoptotische Wirkung. TAT-513 führt wie TAT-524, jedoch deutlich geringer, zu einer Zunahme des SubG1-Anteils, auch hier ist allerdings, verglichen zur Negativkontrolle, keine Erhöhung vorhanden. Ähnlich dem Einfluss auf die SubG1-Phase sind auch die Effekte auf die S-Phase mit einer 1,6-fachen Senkung sowie der G1-Phase mit einer Zunahme um 2,3 % wesentlich schwächer als bei TAT-524. Verglichen zu den unbehandelten Zellen lässt sich durch TAT-513 schließlich eine teils PA-unabhängige und gegenüber TAT-524 schwächere Seigerung der G1-Phase um 8,1 % feststellen.

Aufgrund des erhöhten SubG1-Anteils durch beide PAB-CoR-Peptide gegenüber TAT sollte eine vermutete Induktion der Apoptose, welche auch durch das Absterben der Zellen angedeutet wurde (Abb. 4.21B), bestätigt werden. Zu diesem Zweck wurde eine FITC-Annexin V- und PI-Färbung durchgeführt und die apoptotischen Zellen anschließend per FACS-Analyse quantifiziert. Dabei sind FITC-PI-doppelt-positive Zellen entweder spät-apoptisch oder nekrotisch, wodurch nur die FITC-positiven Zellen ein eindeutiger Nachweis der Apoptose sind und deren frühes Stadium kennzeichnen. Zum Ablösen der LNCaP-Zellen von der Zellkulturschale eignet sich Trypsin besser als Accutase (nicht gezeigt).

Zuerst wurden verschiedene Substanzen zur Ermittlung einer Positivkontrolle für die Apoptose-Induktion in LNCaP-Zellen getestet (Abb. A2). Dabei induziert 125 μ M Flufenaminsäure (FS), welches die AR-Proteinmenge verringert (Zhu *et al.*, 1999), nach 48 h die Apoptose am stärksten (3,6-fach). Die dreitägige FS Behandlung zeigt dabei eine weniger starke Induktion, dafür aber einen leichten Anstieg der PI-gefärbten Zellen, was auf die späte Phase der Apoptose neben einer Nekrose-Induktion hindeutet. Demnach haben die Zellen bereits größtenteils die Membranintegrität verloren. Somit sind zwei Tage FS-Behandlung zum Nachweis der Apoptose-Induktion über Annexin V geeignet.

Die PAB-CoR-Peptid Behandlung zur Detektion der vermuteten Apoptose-Induktion erfolgte über verschiedene Zeiträume. Nach 36 h konnte keine erhöhte Annexin V Konzentration durch die beiden PAB-CoR-Peptide auf den LNCaP-Zellen nachgewiesen werden. Es waren außerdem kaum wachstumsinhibierende Effekte zu verzeichnen (nicht gezeigt), welche jedoch zuvor nach fünf Tagen drastisch waren (Abb. 4.21B). Scheinbar ist der Zeitpunkt zum Nachweis einer möglichen Induktion von Apoptose zu früh. Nach 48 h (Abb. 4.23A) führt 18 nM TAT zur ca. dreifachen Verringerung der Annexin V-positiven Zellen und auch die

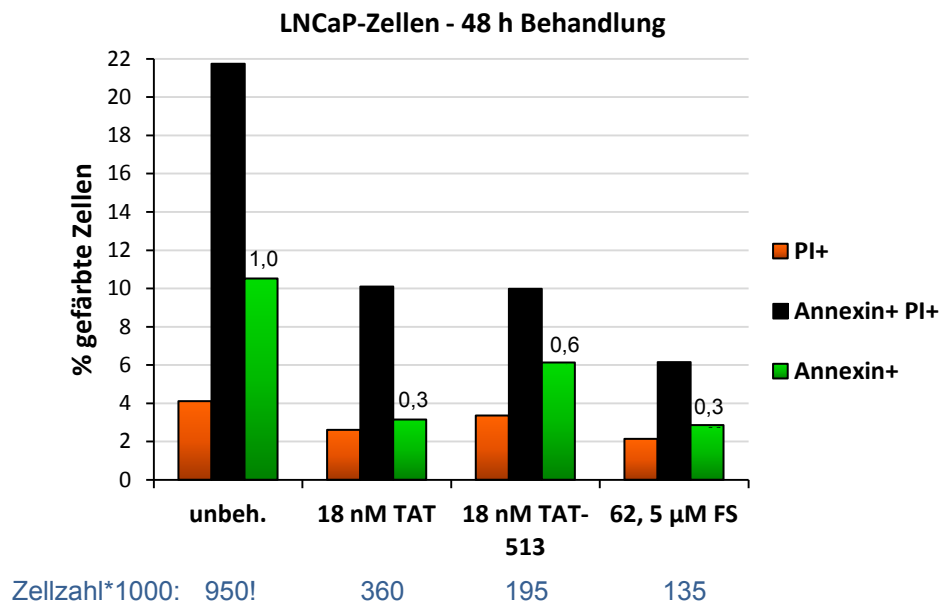
gleichzeitig PI- sowie ausschließlich PI-gefärbten Zellen sind reduziert. Das Kontrollpeptid scheint also einen anti-apoptotischen, das heißt einen schützenden bzw. *survival* Effekt zu haben, was die Ergebnisse aus der Zellzyklus-Analyse bestätigt (Abb. 4.22). Hinsichtlich der Zellzahl ist kein Vergleich zur unbehandelten Kontrolle möglich, da diese Zellen von einer größeren Kulturschale stammen als die im Experiment verwendeten. Bezüglich TAT steigert 18 nM TAT-513 ausschließlich die Annexin V-positiven Zellen zweifach. Der Anteil der sterbenden Zellen (PI-gefärbte) wird durch TAT-513 nur geringfügig erhöht bei gleichzeitig knapp halbierten Wachstumsrate.

Schließlich ist, verglichen zur unbehandelten Kontrolle, eine 1,7-fache Inhibierung des Apoptosemarkers sowie eine zweifache Reduktion der gleichzeitig Annexin V- und PI-positiven Zellen vorhanden. TAT-524 wurde zu diesem Zeitpunkt nicht gemessen, da lichtmikroskopisch keine veränderte Zellzahl und Morphologie sichtbar war. Die halbierte FS-Konzentration (62,5 μ M) induziert währenddessen keine Apoptose trotz reduzierter Zellzahl (Abb. 4.23A).

Nach 72 h (Abb. 4.23B) wird ebenfalls die Senkung der Apoptoserate, sowohl durch 18 nM TAT als auch durch 55 nM TAT vermittelt. 18 nM TAT-513 steigert vorwiegend den Anteil an Annexin V-positiven Zellen (dreifach) gegenüber TAT, was mit der Erhöhung der SubG1-Phase (Abb. 4.22) im Einklang steht. Die Zellzahl ist dabei um das 2,3-Fache gesenkt. Verglichen zur unbehandelten Kontrolle erhöht TAT-513 demnach den spezifischen Apoptosemarker 1,5-fach, während die PI-positiven Zellen 2,4-fach gesteigert sind und zugleich 1,5-fach mehr doppelt gefärbte Zellen vorhanden sind. Nach 96 h waren kaum noch lebende Zellen vorhanden (nicht gezeigt).

Daher kann anhand der gemessenen Zeitpunkte von einer Apoptose-Induktion in LNCaP-Zellen durch 18 nM TAT-513, beginnend nach 48 h mit einem Maximum nach 72 h, ausgegangen werden. Diese führt zum fast vollständigen Absterben der Zellen nach 96 h, wobei aufgrund der PA-unabhängig erhöhten PI-Färbung auch Nekrose beteiligt sein könnte. Dieser eindeutige Nachweis der frühen Apoptose mittels FITC-Annexin V durch TAT-513 wurde nicht in der Zellzyklus-Analyse angedeutet (Abb. 4.22). Ein Grund könnte der relativ frühe Zeitpunkt (72 h) nach Behandlung sein, da mit dem SubG1-Anteil die bereits fragmentierte DNA und somit die letzte Apoptose-Phase erfasst wird.

A



B

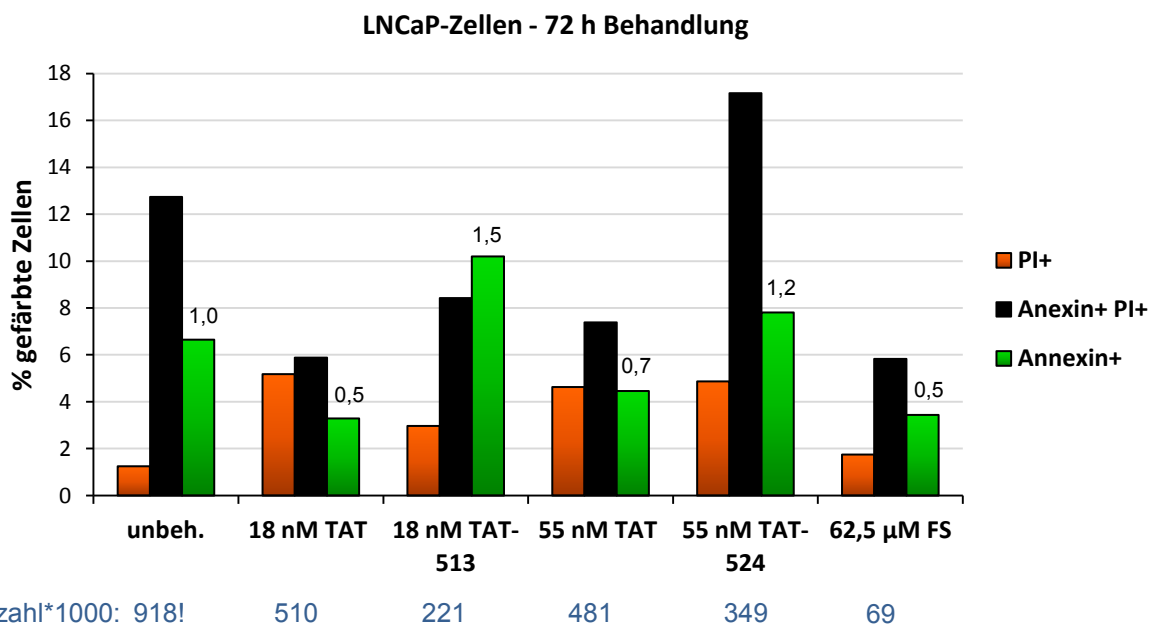


Abb. 4.23) In LNCaP-Zellen induziert 18 nM TAT-513 nach 72 h PA-abhängig Apoptose und halbiert die Zellzahl, während 55 nM TAT-524 keinen Effekt hat und das Wachstum schwächer hemmt

Die Messung der Apoptose-Induktion ist anhand der FITC-Annexin V-Färbung gezeigt. 300.000 LNCaP-Zellen wurden in 6-Well ausgesetzt und 24 h später für 48 h (A) und 72 h (B) mit 55 nM TAT-524 oder 18 nM TAT-513 sowie dem entsprechend konzentrierten TAT-Peptid als Kontrolle behandelt. FS (Flufenaminsäure) diente als Positivkontrolle, allerdings reichte die Konzentration nicht aus. Unten ist die jeweilige Zellzahl nach abgeschlossener Behandlung dargestellt, welche kurz vor der Färbung in Neubauer-Zählkammern ermittelt wurde. Die Zellzahl war dabei nicht geringer als am Tag 0 (186.000), jedoch stammen die nicht behandelten Zellen von einer größeren Kulturschale (! Markierung) und sind daher hinsichtlich der Zellzahl nicht vergleichbar. Gezeigt ist jeweils der durch FACS-Analyse quantifizierte Anteil der PI-positiven (PI+), FITC-Annexin V-(Annexin+) sowie doppelt positiven (Annexin+PI+) Zellen. Die Zahlen über den Balken geben jeweils den fachen Unterschied des Anteils der Annexin V-positiven Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen an. Dieses Experiment wurde nur einmal durchgeführt.

55 nM TAT-524 erhöht nach 72 h ebenfalls den Anteil der apoptotischen Zellen (1,7-fach) gegenüber TAT (Abb. 4.23A). Dies korreliert direkt mit der gleichermaßen hochregulierten SubG1-Phase (Abb.4.22), während die zugleich PI-positiven Zellen in etwa verdoppelt sind bei nur leicht gehemmten Wachstum (1,4-fach). Insgesamt ergibt sich daraus keine eindeutige Apoptose-Induktion, verglichen zur unbehandelten Kontrolle, lediglich um 1,3-fach sind die doppelt-gefärbten Zellen vermehrt. Hingegen hat TAT-524 einen deutlichen, knapp vierfachen PA-unabhängigen Anstieg der PI-gefärbten Zellen zur Folge. Somit besteht schließlich offenbar eine unspezifische Nekrose-Induktion durch TAT-524, wohingegen die erhöhte Apoptoserate bezüglich TAT, sowohl die des spezifischen Apoptosemarkers als auch der SubG1-Phase (Abb. 4.22), im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nicht mehr vorhanden ist. Beispielhafte Dotplots nach 72 h Behandlung sind in Abb. A3 gezeigt.

Nach fünf Tagen (Behandlung am Tag 0 und 3) konnte, entgegen der Wachstums hemmung in Abb. 4.21B, kein weiterer Effekt durch 55 nM TAT-524 beobachtet werden (nicht gezeigt). Für die Behandlung am Tag 3 wurde dabei eine zuvor aufgetaute Proteinlösung verwendet, was offensichtlich die Funktionalität zerstört, so dass am Tag 5 keine Aussage zum Einfluss auf die Apoptoserate getroffen werden kann. Das zweimalige Frieren und Tauen scheint hingegen die TAT-513 Funktion nicht zu beeinträchtigen (Abb. 4.21C).

Demzufolge hat in LNCaP-Zellen 18 nM TAT-513 eine wachstumshemmende Wirkung nach 72 h, welche zum Teil durch Apoptose-Induktion in Abhängigkeit des PA vermittelt wird. Bei 55 nM TAT-524 ist die Wachstumsinhibierung, entgegen der starken Reduktion nach fünf Tagen (Abb. 4.21B), nach 72 h nur leicht ausgeprägt. TAT-524 scheint unspezifisch Nekrose zu induzieren, während kein apoptotischer Effekt besteht.

Im Anschluss sollte die Wirkung der PAB-CoR-Peptide in den androgenunabhängigen C4-2- und den AR-negativen PC3-Zellen, als Nachweis der AR-Spezifität, getestet werden. Die Suche nach einer geeigneten Positivkontrolle für die Induktion von Apoptose ergab für C4-2-Zellen ebenfalls eine Behandlung mit 125 μ M FS (Abb. A4). In PC3-Zellen erwies sich 3,5 μ M Doxorubicin (Doxo) für 72 h als effektiv, während FS wirkungslos ist und somit die Apoptose-Induktion als Folge des AR Abbaus (Liao *et al.*, 2005) bestätigt.

In C4-2-Zellen inhibieren 18 sowie 55 nM TAT, ähnlich wie in LNCaP-Zellen die Apoptoserate (Abb. 4.24). Auch die Zellzahl ist gleichermaßen gesenkt durch beide Konzentrationen. 55 nM TAT-524 reduziert den Anteil der apoptotischen Zellen geringfügig (1,3-fach), die

Zellzahl ist ebenso leicht verringert wie in LNCaP-Zellen, während die PI-haltigen Zellen knapp zweifach reduziert sind. Somit ergibt sich durch TAT-524 insgesamt eine zum Teil PA-unabhängige Hemmung der Apoptose sowie des Wachstums (jeweils ca. 1,7-fach) bei gleichzeitig PA-abhängiger Senkung (1,6-fach) der sterbenden Zellen.

18 nM TAT-513 hat gegenüber TAT keinen steigernden Effekt auf den Apoptosemarker, entgegen der deutlichen FITC-Annexin V-Induktion in LNCaP-Zellen, wobei das Wachstum jedoch gleichermaßen, das heißt beinahe zweifach, inhibiert wird. Demnach führt TAT-513 in C4-2-Zellen gegenüber der unbehandelten Kontrolle, ähnlich wie in LNCaP-Zellen, zur PA-vermittelten Wachstumshemmung, jedoch ohne Beteiligung von Apoptose, welche sogar leicht PA-unabhängig gesenkt ist. In C4-2-Zellen wirken folglich beide Peptide ohne Induktion von Nekrose sowie tendenziell anti-apoptotisch. Dabei wird die Proliferation insbesondere sowie PA-vermittelt durch TAT-513 inhibiert.

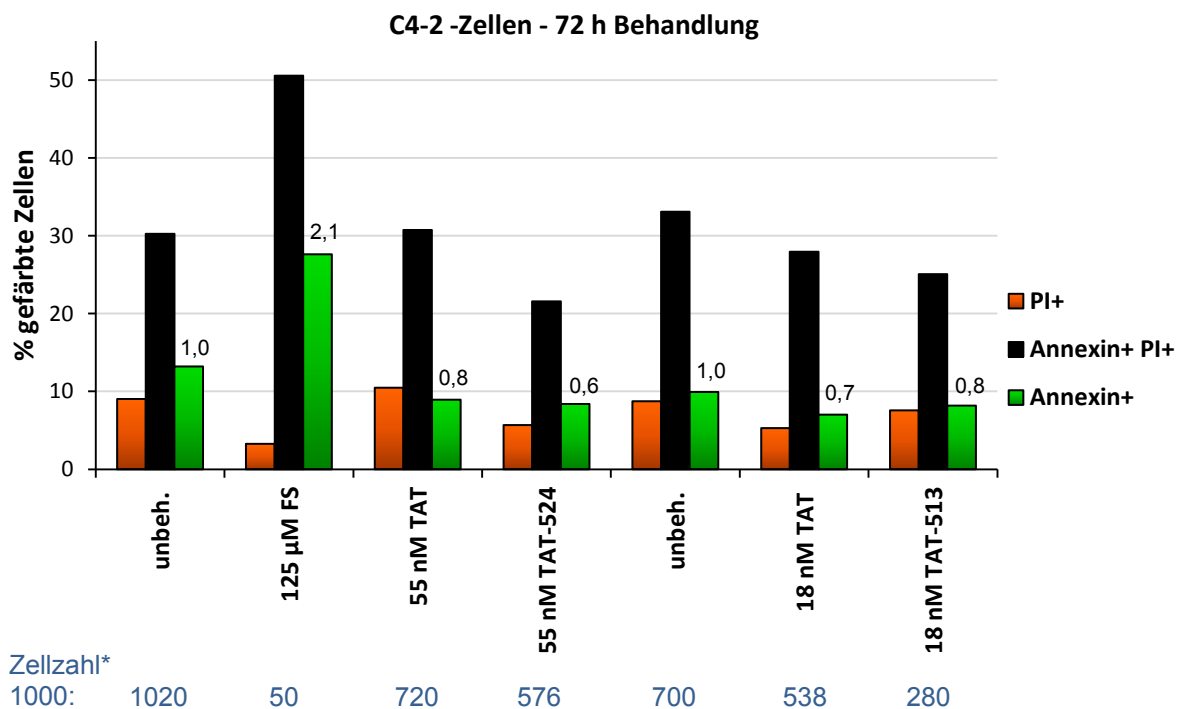


Abb. 4.24) In C4-2-Zellen inhibieren beide PAB-CoR-Peptide leicht die Apoptoserate sowie das Wachstum, welches durch TAT-513 stärker und PA-vermittelt gehemmt wird

Die Messung der Apoptose-Induktion ist anhand der FITC-Annexin V-Färbung gezeigt. Die Behandlung für 72 h und die Analyse erfolgte wie in Abb. 4.23. Die Zahlen über den Balken geben jeweils den fachen Unterschied des Anteils der Annexin V-positiven Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen an. Dieses Experiment wurde nur einmal durchgeführt.

In PC3-Zellen führt 55 nM TAT-524 geringfügig (1,3-fach) zur Abnahme des Apoptosemarkers, verglichen zu TAT, welches jedoch alleine die Annexin V- und PI-doppelt

gefärbten Zellen leicht erhöht (1,4-fach) und die Zellzahl halbiert (Abb. 4.25). Gegenüber der unbehandelten Kontrolle bewirkt TAT-524 dementsprechend eine PA-unabhängige 2,6-fache Wachstumshemmung, wobei in Abhängigkeit des PA 524 eine leichte Verringerung der Apoptose erfolgt. Gegenüber den unbehandelten PC3-Zellen erhöht 18 nM TAT-513 den Apoptosemarker zum Teil PA-vermittelt um das 1,7-Fache und steigert PA-unabhängig den Anteil PI-haltiger Zellen (1,7-fach), ohne jedoch dabei das Wachstum zu hemmen.

Schlussfolgernd hat TAT-513 in den AR-negativen PC3-Zellen lediglich eine geringfügige Apoptose-Induktion gegenüber TAT (1,4-fach) zur Folge, verglichen zur dreifachen Erhöhung in LNCaP-Zellen (Abb. 4.23B). Zugleich jedoch erfolgt durch TAT-513 keine Wachstumshemmung der PC3-Zellen. TAT-524 hingegen vermindert die Zellzahl PA-unabhängig und deutlicher als in C4-2-Zellen und erhöht währenddessen nicht die Apoptoserate, ähnlich wie in den beiden AR-positiven PCa-Zelllinien.

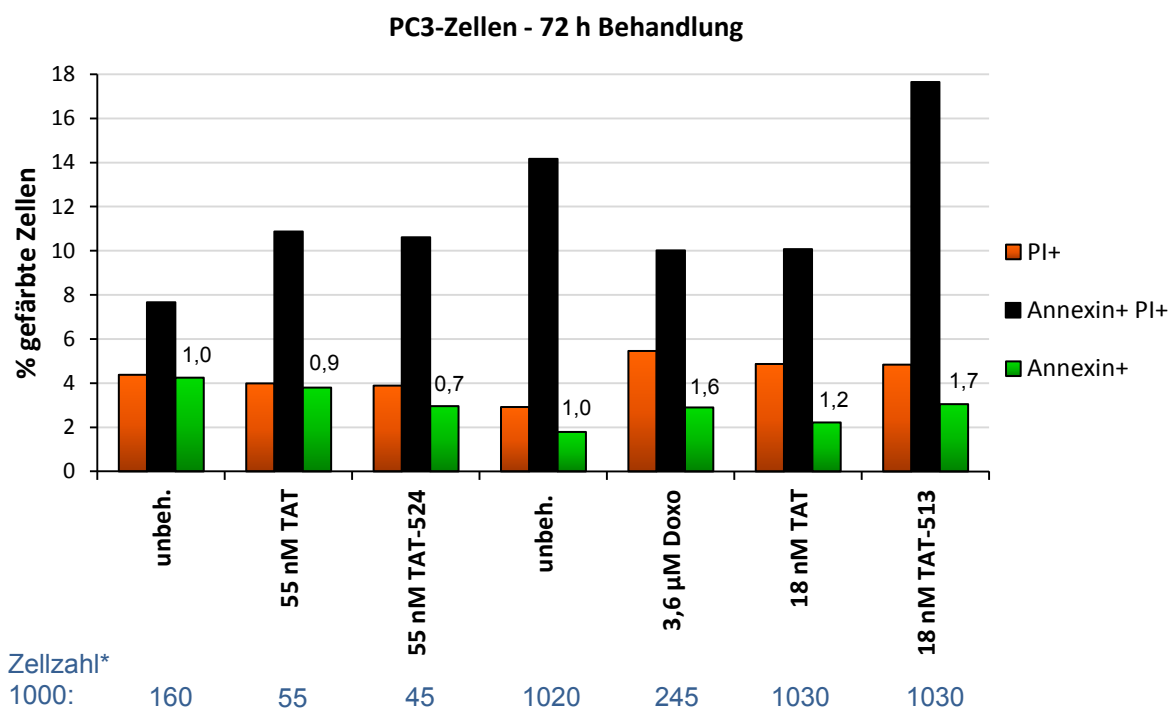


Abb. 4.25) In PC3-Zellen hemmt TAT-524 PA-unabhängig das Wachstum bei leichter anti-apoptotischer Wirkung, während TAT-513 lediglich die Apoptose geringfügig erhöht

Die Messung der Apoptose-Induktion ist anhand der FITC-Annexin-Färbung gezeigt. Die Behandlung für 72 h und die Analyse der PC3-Zellen erfolgte wie in Abb. 4.23. Als Positivkontrolle diente hierbei 3,6 µM Doxorubicin (Doxo). Die Zahlen über den Balken geben jeweils den fachen Unterschied des Anteils der Annexin-positiven Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen an. Dieses Experiment wurde nur einmal durchgeführt.

Als weiterer Mechanismus der Wachstumshemmung könnte aufgrund des jeweils durch die PAB-CoR-Peptide gestiegenen Anteils der G1-Phase (Abb. 4.22), eine Induktion zellulärer Seneszenz als Mechanismus des irreversiblen Zellzyklusarrests in Frage kommen. Zur Analyse wurde in LNCaP- und C4-2-Zellen nach 72 h Behandlung eine Seneszenz-assoziierte-(SA)-beta-Gal-Färbung durchgeführt (Abb. 4.26). Denn bei zellulärer Seneszenz sind die lysosomalen beta-Galactosidasen überexprimiert, so dass diese spezifisch in seneszenten Zellen bei einem pH von 6.0 aktiv sind und als Marker dienen (Lee *et al.*, 2006). Der relativ hohe Basalwert an SA-beta-Gal positiven Zellen von über 20 % ist wahrscheinlich durch die geringe Ausgangszellichte, 10 % LNCaP- und 15 % C4-2 –Zellen, bedingt.

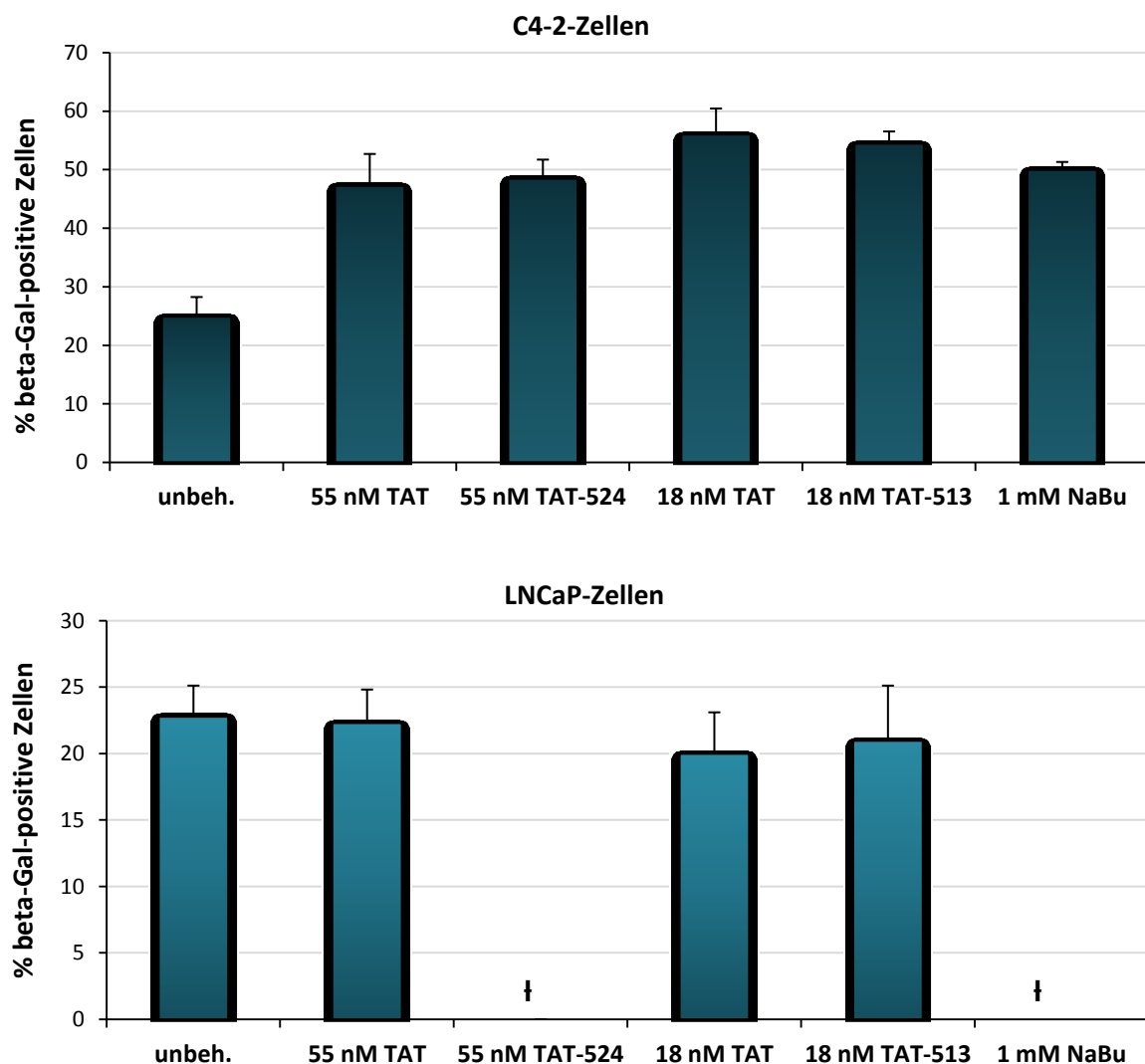


Abb. 4.26) Der Anteil an SA-beta-Gal positiven Zellen ist durch die PAB-CoR-Peptide in LNCaP-Zellen unverändert, während dieser in C4-2-Zellen PA-unspezifisch verdoppelt ist

Zum spezifischen Nachweis der SA-beta-Gal als Marker der zellulären Seneszenz wurden jeweils 15 % LNCaP- und C4-2-Zellen in 6-WellS ausgesät. 24 h später erfolgte die Behandlung für 72 h mit 55 nM

TAT-524 und 18 nM TAT-513, dem entsprechend konzentrierten TAT Kontrollpeptid sowie 1 mM Natriumbutyrat (Nabu) als Positivkontrolle. Anschließend wurden die Zellen mit dem Substrat X-Gal bei pH 6,0 inkubiert. Angegeben ist der Anteil der positiv-gefärbten Zellen in %. Das Zeichen „†“ bedeutet, dass die Zellen nach der Behandlungszeit abgestorben sind. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung vom Mittelwert einer Zweifachbestimmung von jeweils 2 x 200 ausgezählten Zellen an. Dieses Experiment wurde nur einmal durchgeführt.

Als Positivkontrolle diente Natriumbutyrat (NaBu), ein Inhibitor der Klasse I und II HDAC (Lorenz *et al.*, 2011). Die LNCaP-Zellen sind durch NaBu sowie 55 nM TAT-524 abgestorben, was durch die geringe Konfluenz und einer damit verbundenen Instabilität der einzelnen Zellen bedingt sein könnte.

Im Gegensatz zu LNCaP-Zellen, bei welchen keine Änderung der basalen SA-beta-Gal Aktivität von circa 22 % durch die Peptide vorhanden ist, wird in C4-2-Zellen der Seneszenzmarker bereits durch das Kontrollpeptid TAT in beiden Konzentrationen generell zweifach erhöht, ohne dass die PA eine weitere Änderung bewirken. Somit wird angedeutet, dass beide PAB-CoR-Peptide in LNCaP-Zellen keine zelluläre Seneszenz induzieren, während diese in C4-2-Zellen PA-unspezifisch zweifach gesteigert wird und möglicherweise der zugrunde liegende Mechanismus der leichten, durch die Kontrollpeptide-vermittelten Wachstumshemmung (Abb. 4.24) ist.

4.2.8) Wirkung der TAT-fusionierten PAB-CoR-Peptide auf die Menge AR-regulierter und Zellzyklus-assoziiierter Proteine

Um die molekularen Mechanismen der Apoptose-Induktion bzw. Wachstumshemmung in LNCaP-Zellen aufzuklären, wurden die Proteinmengen des ARs sowie wichtiger Zellzyklusregulatoren, welche u. a. vom AR beeinflusst werden, mittels Westernblot-Analysen untersucht. Zu diesem Zweck wurden die LNCaP-Zellen für 72 h mit den Peptiden 55 nM TAT-524, 18 nM TAT-513 sowie 125 µM FS als Positivkontrolle für den AR Abbau (Zhu *et al.*, 1999), welcher eventuell auch als Ursache der Apoptose-Induktion durch TAT-513 in Frage kommt, behandelt. Unbehandelte PC3-Zellen dienten ebenfalls als Kontrolle für die Abwesenheit des ARs und der daraus folgenden Änderung der AR-regulierten Proteine. Die Extrakte der LNCaP-Zellen stammen aus der Behandlung für die Apoptose-Analyse (Abb. 4.23B), wobei nach 72 h, verglichen zum TAT Kontrollpeptid, eine 2,3-fache Reduktion der Proliferation durch TAT-513 und eine 1,4-fache Hemmung durch TAT-524 erfolgte. Die Ausgangszellzahl wurde dabei nicht unterschritten.

Die Untersuchung des AR-Proteins, welches von PAB-CoR 9R-524 nachweislich spezifisch gebunden wird (Abb. 4.10), ergab eine 1,5-fache Reduktion durch 55 nM TAT bzw. 15 % Anteil DP 9 (Abb. 4.27). Das zusätzliche PA 524 verändert dabei nicht die Wirkung. 18 nM TAT bzw. 10 % DP 9 (v/v) beeinflussen hingegen nicht die AR-Proteinmenge, wodurch die Spezifität der TAT-513 vermittelten knapp zweifachen AR Verringerung nachgewiesen ist. 55 nM TAT führt des Weiteren zur 2,4-fachen Hemmung der zwei ca. 70 - 80 kDa großen und vermutlich LBD-negativen AR-Splicevarianten sowie einer ähnlich starken Inhibierung des PSA-Proteins, dessen Genexpression durch den AR induziert wird. 55 nM TAT-524 führt im Vergleich zu den unbehandelten Zellen etwas stärker zur Reduktion der AR-Isoformen (3,4-fach) sowie von PSA (vierfach).

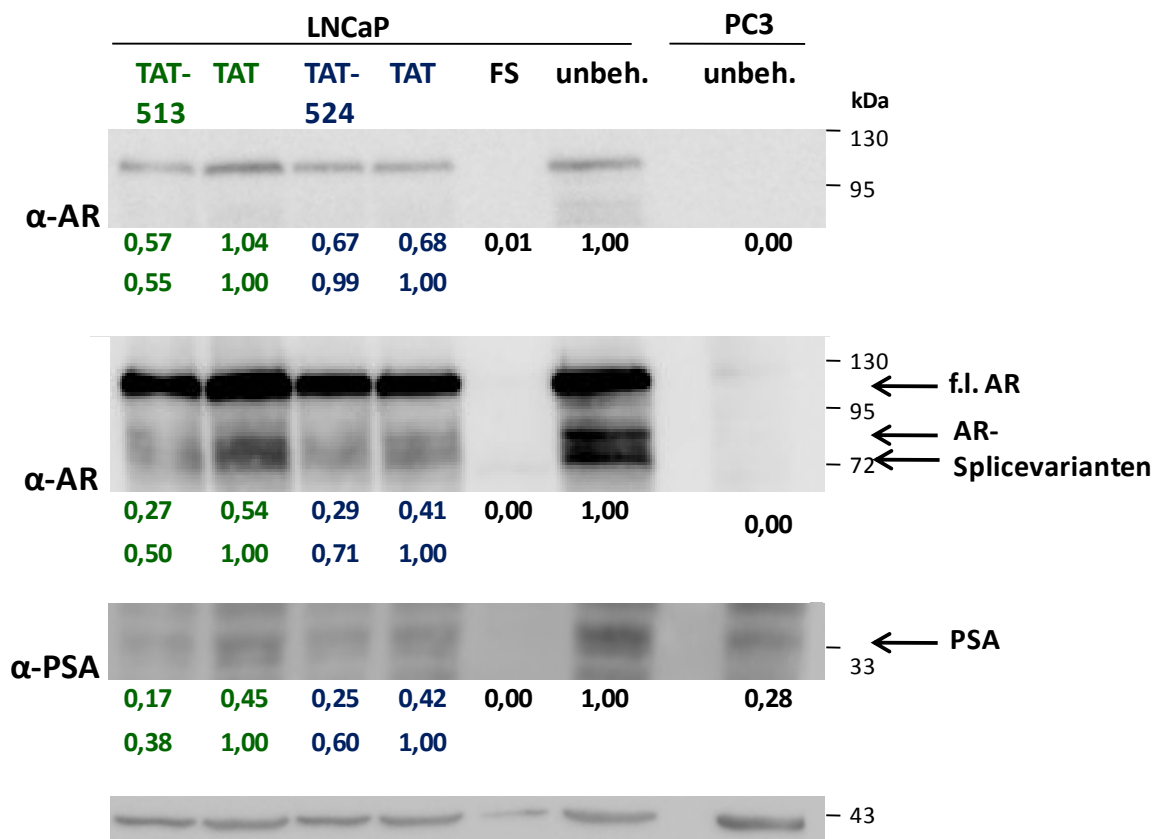


Abb. 4.27) In LNCaP-Zellen reduziert TAT-524 das AR-Protein PA-unabhängig, während TAT-513 dies PA-abhängig vermittelt und auch PSA stärker sowie die kürzeren AR-Splicevarianten spezifischer vermindert

Für die Westernblot-Analysen der Proteine AR, PSA und Aktin wurden LNCaP-Zellen 72 h mit 55 nM TAT-524, 18 nM TAT-513, den entsprechend konzentriertem TAT Kontrollpeptid sowie 125 µM FS als Kontrolle für den AR Abbau (Zhu *et al.*, 1999) behandelt. Die Extrakte stammen aus der Apoptose-Analyse nach 72 h (Abb. 4.23B). Als Kontrolle wurden außerdem die AR-negativen PC3-Zellen verwendet. Die darunter stehenden Zahlen sind die densitometrisch quantifizierten und mit Aktin normalisierten fachen Unterschiede, wobei zum Einen die unbehandelten Zellen gleich 1 gesetzt

wurden (obere Reihe) und zum Anderen die TAT behandelten Zellen (untere Reihe). Diese Experimente wurden nur einmal durchgeführt.

18 nM TAT zeigt ebenfalls bereits eine ca. zweifache Hemmung der AR-Splicevarianten sowie von PSA. Die durch TAT-513 vermittelte Verringerung beider ist jedoch wesentlich stärker, so werden PSA beinahe sechsfach und die AR-Splicevarianten 3,7-fach gegenüber der unbehandelten Kontrolle inhibiert. Bei PC3-Zellen sind neben dem fehlenden f.l. AR auch keine AR-Isoformen in dieser Größe nachweisbar, PSA wird hingegen exprimiert, jedoch vierfach reduziert, verglichen zu LNCaP-Zellen. Bekannt ist, dass die PSA-Expression unabhängig vom AR reguliert werden kann (Hsieh und Wu, 2000; Yeung *et al.*, 2000).

Insgesamt hat 18 nM TAT-513 auf die untersuchten Proteinmengen des ARs, dessen Isoformen sowie Zielgenprodukts einen etwas stärkeren und vor allem spezifischeren, das heißt PA-abhängigeren Effekt als 55 nM TAT-524. Dieses vermittelt keine AR Reduktion und reguliert die anderen Proteine kaum mehr als die TAT Kontrolle.

Als nächstes wurde Cyclin D1 untersucht, da es durch den aktivierten AR über mTOR akkumuliert wird (Balk und Knudsen, 2008) und den Übergang von der G1- in die S-Phase fördert. TAT hemmt Cyclin D1 in beiden Konzentrationen nur leicht. Währenddessen erzeugen beide PA deutliche Effekte auf die Cyclin D1-Proteinmenge, TAT-513 wesentlich stärker mit einer 2,7-fachen Hemmung als TAT-524 mit einer 2,3-fachen Verminderung, verglichen zu den Kontrollpeptiden (Abb. 4.28). Somit bewirken beide PAB-CoR-Peptide gegenüber den unbehandelten Zellen eine ähnliche, knapp vierfache Inhibierung des Cyclin D1-Proteins, während TAT-513 dies PA-spezifischer vermittelt.

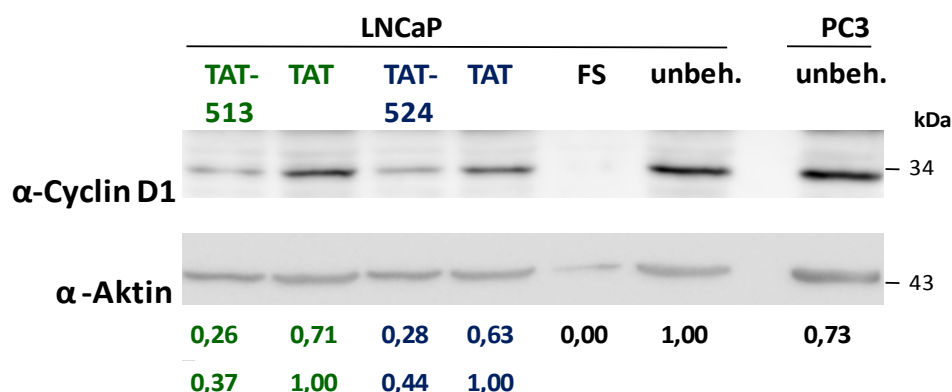


Abb. 4.28) Beide PAB-CoR-Peptide, TAT-513 PA-spezifischer, haben eine starke Verringerung der Cyclin D1-Proteinmenge zur Folge.

Die Westernblot-Analyse für Cyclin D1 wurde mit derselben Membran wie in Abb. 4.27 durchgeführt. Die darunter stehenden Zahlen sind die densitometrisch quantifizierten und mit Aktin normalisierten

fachen Unterschiede, wobei zum Einen die unbehandelten Zellen gleich 1 gesetzt wurden (obere Reihe) und zum Anderen die TAT behandelten Zellen (untere Reihe). Dieses Experiment wurde nur einmal durchgeführt.

Des Weiteren spielt die Menge der aktiven Src-Kinase eine entscheidende Rolle, da zum Einen der AR durch *rapid signaling* (Chang *et al.*, 2007) und Membran-assoziierte Isoformen die Src-Kinase aktiviert (Yang *et al.*, 2011). Zum Anderen wird die Corepressorfunktion von LCoR durch Src in LNCaP- und C4-2-Zellen unterschiedlich reguliert (Abb. 4.3 und 4.5), wodurch ein gegenseitiger Einfluss zwischen Src und den synthetischen CoR vermutet werden kann. Dementsprechend wurde die Src-Aktivität mittels der Autophosphorylierung (Y416) nach der PAB-CoR Behandlung untersucht. Das Kontrollpeptid TAT erniedrigt in beiden Konzentrationen ungefähr zweifach die Menge an phosphoryliertem Src, wobei nur TAT-524 einen geringfügig stärkeren Effekt hat (nicht gezeigt).

Zusätzlich wurden die Zellzyklus-regulierenden Tumorsuppressoren p21 und p27 untersucht, welche auch durch den AR reguliert werden und den Eintritt in die S-Phase durch Hemmung der *Cyclin dependent Kinases* (CDK) blockieren. p21 ist ein direktes AR-Zielgen (Lu *et al.*, 1999), während der AR die Degradierung von p27 bewirkt (Balk und Knudsen, 2008).

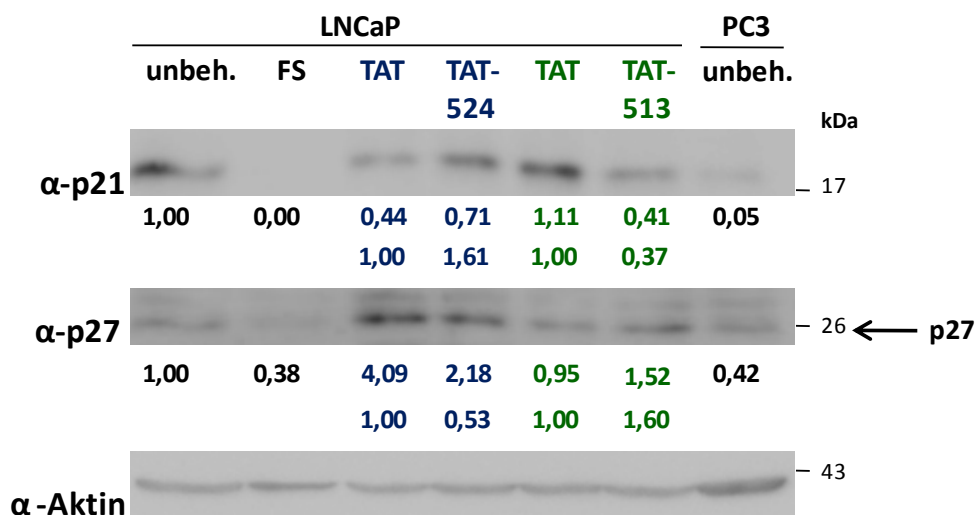


Abb. 4.29) TAT-513 reduziert p21 und erhöht p27 jeweils spezifisch auf Proteinebene, wohingegen TAT-524 diese Reaktionen PA-unabhängig und bei p21 nur leicht vermittelt

Die Westernblot-Analyse für p21, p27 und Aktin wurde mit denselben Zellextrakten wie in Abb. 4.27 auf einer anderen Membran durchgeführt. Die darunter stehenden Zahlen sind die densitometrisch quantifizierten und mit Aktin normalisierten fachen Unterschiede, wobei zum Einen die unbehandelten Zellen gleich 1 gesetzt wurden (obere Reihe) und zum Anderen die TAT behandelten Zellen (untere Reihe). Dieses Experiment wurde nur einmal durchgeführt.

18 nM des PAB-CoR-Peptids TAT-513 verringern die p21-Proteinmenge 2,7-fach, wobei 18 nM TAT keinen Einfluss hat (Abb. 4.29). 55 nM TAT-524 erhöht zwar die p21 Expression etwas verglichen zu TAT, jedoch hat dieses eine hemmende Wirkung. Somit wird im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, wenn auch nur leicht (1,4-fach) und PA-unabhängig, eine p21 Reduktion durch TAT-524 erzeugt.

Durch 55 nM TAT wird p27 massiv erhöht (vierfach), was durch die Beteiligung des PA 524 jedoch um die Hälfte reduziert wird, so dass durch TAT-524 die p27-Menge dennoch verdoppelt ist gegenüber der unbehandelten Kontrolle (Abb. 4.29). 18 nM PAB-CoR TAT-513 zeigt hingegen eine spezifische 1,6-fache Induktion der p27-Proteinmenge.

Ein weiterer wichtiger Tumorsuppressor zur Kontrolle des Übergangs der G1- zur S-Phase ist pRb, welches durch die Cdk schrittweise phosphoryliert und somit inaktiviert wird, so dass E2F-Zielgene wie z.B. Cyclin A transaktiviert werden und so die DNA-Replikation eingeleitet wird. Im hypophosphorylierten Zustand hingegen bindet und hemmt pRb die E2F-Transkriptionsfaktoren. pRb wird außerdem indirekt in vielfältiger Weise durch den AR phosphoryliert und somit inaktiviert (Balk und Knudsen, 2008).

TAT steigert in beiden Konzentrationen massiv den Anteil an Phospho(Ser 807, 811)-pRb am gesamten pRb, was durch das hinzukommende PA 513 stärker gehemmt wird (Abb. 4.30), so dass im Endeffekt 18 nM TAT-513 eine 1,4-fache Hemmung der Phosphorylierung und somit eine Aktivierung dieses Tumorsuppressors erreicht.

TAT-524 hingegen bewirkt, verglichen zur unbehandelten Kontrolle, eine dreifache Erhöhung der pRB-Phosphorylierung und folglich eine pRb-Inaktivierung, welche vorwiegend ohne Beteiligung des PA 524 vermittelt wird.

Des Weiteren wird die Gesamtmenge von pRb durch 55 nM TAT-524 deutlich reduziert, ohne dass TAT in dieser Konzentration einen Einfluss hat (Abb. 4.30). Dies ist der einzige PA-abhängige Effekt von 55 nM TAT-524 innerhalb der untersuchten Proteine. 18 nM TAT hingegen senkt die Gesamtmenge von pRb ungefähr zweifach, während TAT-513 diese wieder auf Ausgangsniveau anhebt und daher TAT-513 gegenüber der unbehandelten Kontrolle nicht die Proteinmenge von pRB, sondern nur dessen Aktivität reguliert.

Insgesamt zeigt TAT-513 (18 nM) eine PA-spezifische Verringerung der AR- und p21-Proteinmenge sowie Erhöhung des p27-Proteins. Cyclin D1 wird ebenfalls überwiegend durch Beteiligung des PA 513 reduziert, das TAT Kontrollpeptid hat nur einen minimalen Effekt (1,4-fach). Neben einer zum Teil PA-unabhängigen Verringerung der verkürzten AR-

Isoformen und PSA, reduziert TAT-513 die Phosphorylierung der Src-Kinase ausschließlich durch die TAT Kontrolle. Andererseits wird die pRB-Phosphorylierung gegensätzlich zu TAT wieder leicht durch TAT-513 verringert.

TAT-524 (55 nM) wirkt deutlich unspezifischer, es reguliert nicht stärker als die TAT Kontrolle den AR sowie dessen Isoformen herunter und den pRB-Phosphorylierungsgrad herauf, während PSA, Cyclin D1 und Phospho-Src ebenfalls zum Teil PA-unabhängig inhibiert werden. Die einzige spezifische Wirkung besteht in der Verringerung der pRb-Gesamtmenge. Wie bei der durch TAT-513 regulierten Phospho-pRb-Menge kommt es auch durch TAT-524 zu einem gegensätzlichen Effekt verglichen zu TAT. So wird durch das PA 524 die vorherige TAT-vermittelte Wirkung umgekehrt und p21 letztendlich verringert und analog p27 erhöht. Letzteres ähnelt der spezifischen Reaktion auf TAT-513, bei TAT-524 überwiegt allerdings der Effekt durch das Kontrollpeptid.

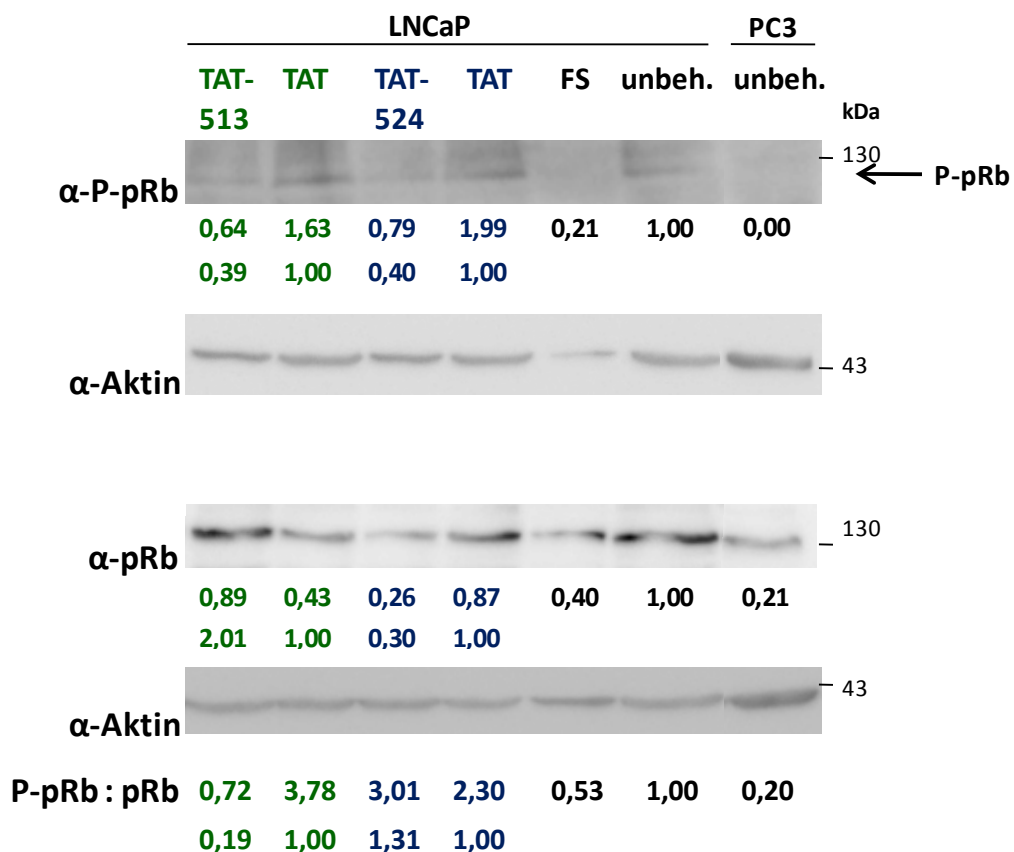


Abb. 4.30) TAT-524 reduziert spezifisch die pRb-Gesamtmenge und erhöht gleichermaßen, jedoch PA-unabhängig dessen Phosphorylierung, welche hingegen durch TAT-513 leicht gesenkt wird

Die Westernblot-Analysen für pRb und Phospho(P)-pRb (Phosphorylierung an Ser 807, 811) wurden mit denselben Zellextrakten wie in Abb. 4.27 auf den verwendeten zwei Membranen durchgeführt. Die darunter stehenden Zahlen sind die densitometrisch quantifizierten und mit Aktin normalisierten fachen Unterschiede, wobei zum Einen die unbehandelten Zellen gleich 1 gesetzt wurden (obere

Reihe) und zum Anderen die TAT behandelten Zellen (untere Reihe). Ganz unten befinden sich außerdem die P-pRb-Werte relativ zu pRb, jeweils mit Aktin normalisiert. Dieses Experiment wurde nur einmal durchgeführt. Die Spuren stammen von demselben SDS-Gel.

Zusammenfassend konnte eine spezifische und R1881-verstärkte Interaktion zwischen 9R-524 und dem AR *in vitro* nachgewiesen werden. Nach der Optimierung verschiedener Parameter für die Aufreinigung mittels GST-Fusion, wie Änderungen in der Expression und enzymatischen Abspaltung durch Thrombin, den Zusatz von Protease-Inhibitoren und Plasmiden für seltene tRNAs, erfolgte die Umstellung auf eine His-Tag-vermittelte Isolation. Dabei stellten sich Hybridkonditionen, das heißt anfangs denaturierende und später native, als sehr geeignet heraus. Nach Anpassung der Eluierungsbedingungen konnte so eine zehnfach bessere Ausbeute gegenüber der GST-vermittelten Aufreinigung erzielt werden.

Des Weiteren sorgte der Austausch der synthetischen PTD 9R- durch die natürliche TAT-Domäne und der anschließende Wechsel des Dialysepuffers für eine PA-spezifische Wachstumshemmung in LNCaP-Zellen durch die PAB-CoR-Peptide im nanomolaren Bereich. Die Proliferationshemmung wird u. a. durch einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase ausgelöst, wobei die wesentlich stärkere Proliferationshemmung durch TAT-513 auch die Folge der Induktion von Apoptose ist.

Außerdem konnte in den androgenunabhängigen C4-2-Zellen eine ähnlich starke spezifische Zellzahlreduktion durch die PAB-CoR-Peptide erreicht werden, jedoch keine Erhöhung der Apoptoserate. Wie in LNCaP-Zellen ist die Induktion von zellulärer Seneszenz ebenfalls nicht beteiligt. Versuche in PC3-Zellen, welche endogen keinen AR exprimieren, deuten auf eine AR-Spezifität von TAT-513 hin.

Die Analyse von Zellzyklusfaktoren in LNCaP-Zellen zeigte eine PA-vermittelte Steigerung des Tumorsuppressors p27 und Verringerung der AR-, Cyclin D1-, und p21-Proteinmengen sowie der pRb-Phosphorylierung durch TAT-513, während TAT-524 einzig die Gesamt-pRB-Menge spezifisch reduziert. Auf Ebene der transkriptionellen Aktivität des ARs ist TAT-513 ebenfalls wirksamer. Dabei hemmt es den wtAR sowie die AR-T877A-Mutante effektiver und in der Gegenwart mehrerer Liganden und darüber hinaus auch die AR-LBD-Deletion.

Demnach konnten im Rahmen dieser Arbeit synthetische CoR hergestellt werden, welche vektorfrei und zellpermeabel den AR und das Wachstum von LNCaP- und C4-2-Zellen im nanomolaren Bereich hemmen. Dies erfolgte insbesondere durch TAT-513 effizient und spezifisch, was mit einer Aktivierung des pRB-Signalwegs assoziiert ist.

5) Diskussion

5.1) In C4-2-Zellen steigert Src-Signaling die LCoR-AR-Interaktion sowie die LCoR-Repression

Wesentliche Mechanismen der Progression zu androgenunabhängigen PCa sind die Überexpression des ARs (Chen *et al.*, 2004) sowie der CoA (Waltering *et al.*, 2012; Chmelar *et al.*, 2007), während CoR vermindert exprimiert (Godoy *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2008) bzw. inaktiviert (Eisold *et al.*, 2009; Dotzlaw *et al.*, 2002) werden können. Daraus ergibt sich eine Überaktivität des ARs durch einen relativen Mangel an funktionellen AR-CoR. Ziel der Arbeit war es, dieses Defizit durch das Einschleusen neuartiger AR-spezifischer CoR auszugleichen und somit den AR und die PCa-Zellproliferation effizient zu inhibieren. Zunächst sollte ein LCoR-basierter CoR, mit einer spezifischen AR-Interaktionsdomäne als Bestandteil, genutzt werden. Asim *et al.* (2011) zeigten, dass LCoR den AR hemmt und im Mausmodell das Wachstum von humanen CRPC-Tumoren inhibiert. Interessanterweise zeigen die Westernblot-Analysen eine im Verhältnis zum AR verminderte LCoR-Proteinmenge in den androgenunabhängigen C4-2-Zellen, verglichen zu den androgenabhängigen LNCaP-Zellen. Bekannt ist, dass die mit CRPC-assoziierte Src-Kinase die AR-Aktivität in C4-2-Zellen sowie deren Invasion fördert (Asim *et al.*, 2008). Um das Potenzial einer möglichst wenig beeinflussbaren AR-Bindung durch die LCoR-Domänen 101-218 sowie 219-433 zu beurteilen, sollte der Effekt von Src auf die Interaktion von f.l. LCoR mit der AR-DBD und auch die Repression eines Reportergens durch Gal-DBD (Gal)-LCoR (bezeichnet als LCoR-Repression) untersucht werden. Diese Analysen erfolgten auch mit Androgenen, da sie die AR-LCoR-Interaktion steigern (Asim *et al.*, 2011). In C4-2-Zellen bewirkt der Src-Inhibitor PP2 eine Verringerung, sowohl der androgenunabhängigen als auch der R1881-verstärkten Interaktion zwischen AR-DBD und LCoR. Demnach kann vermutet werden, dass Src-Signaling die LCoR-AR-Interaktion fördert. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die ähnlich beeinflusste LCoR-Repression sein. Somit scheint LCoR in C4-2-Zellen durch das Src-Signaling aktiviert zu werden. Weitere Hinweise dafür lieferten die ektopische Expression einer dominant-negativen sowie konstitutiv-aktiven Src-Mutante, wobei eventuell Ras die durch Src-verstärkte LCoR-Funktion vermitteln könnte.

Eine Hypothese der LCoR Aktivierung durch R1881 bzw. Src könnte sein, dass der in beiden Fällen aktivierte und somit dimerisierte AR mit der Promotor-(4xUAS)-gebundenen

Gal-LCoR-Fusion interagiert (Abb. 5.1, Variante 1). Die AR-Dimere könnten als Plattform wiederum vermehrt zelluläres oder ektopisches LCoR an den Komplex rekrutieren und somit zur gesteigerten Repression des Reportergens führen. So kann spekuliert werden, dass LCoR eine höhere Affinität zu AR-Dimeren gegenüber -Monomeren hat. Im Einklang damit steht, dass PP2 auch die Androgen-induzierte Bindung des zellulären AR an die AR-DBD hemmt. Diese Interaktion repräsentiert wahrscheinlich die AR-Homodimerisierung, welche über die DBD vermittelt wird (van Royen *et al.*, 2012). Schließlich könnte die Src-vermittelte AR (Y534)-Phosphorylierung und somit AR Aktivierung (Guo *et al.*, 2006) über die AR-Dimerisierung eine vermehrte Rekrutierung von LCoR bewirken, da die Dimerisierung des ARs mit dessen Aktivierung einhergeht (Yuan *et al.*, 2013).

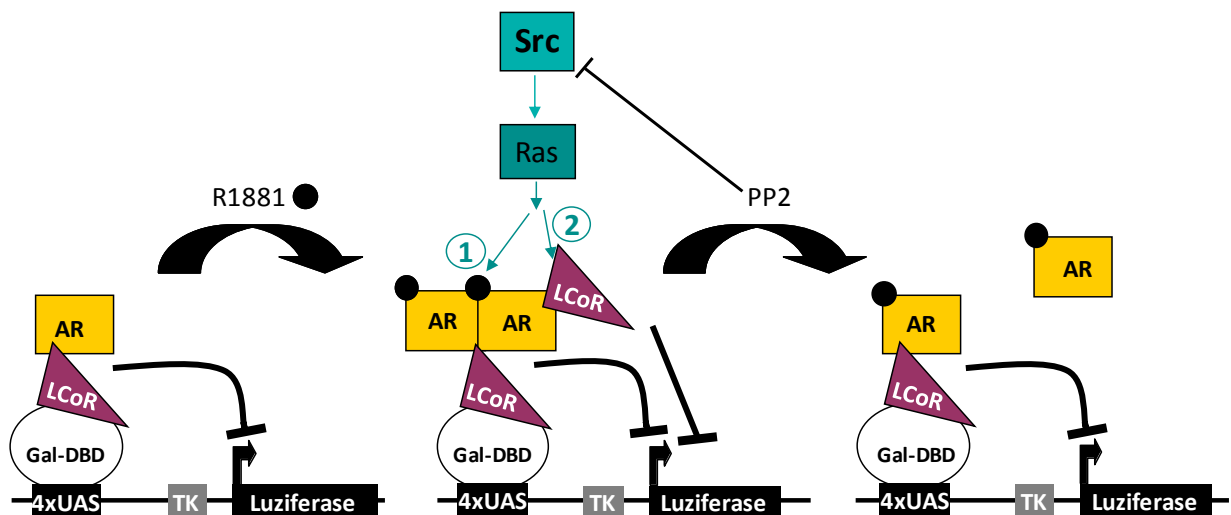


Abb. 5.1) Modell der Src- und R1881-verstärkten LCoR-Repression in C4-2-Zellen

Die Interaktionsstudien mittels GST-Pulldown zeigen, dass R1881 zum Einen die AR-Dimerisierung und zum Anderen die AR-LCoR-Interaktion fördert. Somit könnten die AR-Dimere als Anker für eine vermehrte LCoR-Rekrutierung dienen. Das Ergebnis ist eine verstärkte Inhibition des Gal-LCoR-bindenden Reportergens. Wird zusätzlich Src durch PP2 inhibiert, kommt es in C4-2-Zellen zur Abschwächung der AR-Homodimerisierung sowie der AR-LCoR-Interaktion. Als Resultat wird die R1881-gesteigerte LCoR-Repression rückgängig gemacht. So könnte Src die LCoR-Repression durch Förderung der AR-Dimerisierung (Variante 1) und folglich der LCoR-Rekrutierung positiv beeinflussen. Dabei könnte Ras als *downstream* Kinase eine Rolle spielen, während die Effekte vermutlich auf Phosphorylierung beruhen. Alternativ wird die LCoR-AR-Interaktion eventuell durch Modifikation von LCoR verstärkt (Variante 2). In Abwesenheit von Hormonen hemmt PP2 geringfügiger die LCoR-AR-Bindung sowie die AR-Dimerisierung und nicht die LCoR-Repression (nicht gezeigt). Dies ist ein Hinweis, dass der Effekt von Src über AR Aktivierung erfolgt, da diese eine positive Rückkopplung der aktivierten Src-Kinase ist.

Entsprechend des positiven Feedbacks, dass die AR-induzierte Src-Kinase wiederum den AR aktiviert (Chang *et al.*, 2007, Migliaccio *et al.*, 2007), ist der inaktive AR nur gering durch Src

phosphoryliert. Folglich hat die Hemmung der somit vermindert aktiven Src-Kinase einen schwächeren Einfluss auf die AR-Aktivität bzw. -Dimerisierung als in Gegenwart von R1881. Der Effekt von PP2 auf die Bindung von f.l. AR sowie LCoR an die AR-DBD in Abwesenheit von R1881 ist tatsächlich schwächer. Auch die LCoR-Repression wird ohne R1881 nicht durch PP2 inhibiert. Diese Ergebnisse sprechen für die Aktivierung des ARs als Ursache der Src-vermittelten LCoR-AR-Interaktion sowie der LCoR-Funktionssteigerung. Nach dieser Vermutung wird LCoR nicht selbst direkt durch Src beeinflusst.

Eine andere Hypothese wäre eine AR-unabhängige und möglicherweise direkte Förderung von LCoR durch *Src-Signaling*. Diese Annahme beruht auf der nicht AR-regulierten LCoR-Repression in den allerdings wenig vergleichbaren CV1-Zellen. In C4-2-Zellen deuten Westernblot-Analysen an, dass die Erhöhung der LCoR-Funktion durch R1881 und die Aufhebung durch PP2 tatsächlich durch die Beeinflussung der LCoR-Proteinmengen bedingt sein könnte. Zum Einen könnte dies auf einer LCoR-Stabilisierung durch Assemblierung mit dem aktivierten AR (s. 5.1, Variante 1) beruhen. Andererseits ist jedoch vorstellbar, dass die Src-Signalkaskade LCoR auf Ebene von posttranslationalen Modifikationen reguliert. LCoR könnte phosphoryliert werden, wodurch es ähnlich der AR-Stabilisierung durch PI3K vor proteasomalem Abbau geschützt wäre (Mellinghoff *et al.*, 2004). Durch eine Src-vermittelte LCoR-Phosphorylierung ist gleichermaßen denkbar, dass eine Interaktionsfläche für den AR entsteht (Abb. 5.1, Variante 2). Darüber hinaus könnte Src die Interaktion mit weiteren CoR oder eine LCoR-Dimerisierung induzieren. So spielt z. B. bei dem CoR SMRT die Dimerisierung für dessen Funktion eine wichtige Rolle (Varlakhanova *et al.*, 2011).

Beide Hypothesen, das heißt ein Src-Einfluss auf entweder den AR oder LCoR, welche jeweils als Ankerprotein für die Assemblierung eines AR-LCoR Komplexes dienen könnte, schließen sich nicht gegenseitig aus und könnten gleichzeitig in C4-2-Zellen bestehen.

In den Steroidhormonrezeptor-negativen CV1-Zellen wurde anschließend untersucht, welcher Bereich des ARs für die LCoR-Repression förderlich ist. Auffällig ist eine generell stärkere LCoR-Repression als in den PCa-Zellen, welche auch für die CoR Alien und NCoR beobachtet wurde (Dissertation M. Asim, 2008). Dies könnte eventuell daraufhin deuten, dass die PCa-Zellen gezielt auf eine verminderte CoR-Funktion als Mechanismus einer höheren AR-Aktivität selektiert wurden. Die Analysen deuten an, dass für die LCoR-Repression die AR-DBD, die angrenzenden AS 447-536 sowie die SUMOylierungsstellen K385 und K518 förderlich sind, während die AF-1 und die AF-2 enthaltende LBD einen negativen

Einfluss haben. Nach dem Modell der LCoR-AR Assemblierung (Abb. 5.1) könnte neben der LCoR-Bindung an die erwartungsgemäße AR-DBD und darüber hinaus an den Bereich 447-536 eine negative Korrelation zwischen der LCoR-vermittelten Repression des Reportergens und AR-bindenden CoA bestehen. So binden neben vereinzelt CoR wie SMRT vor allem CoA (ARA160, CBP, p160 Familie, ART 27, p102 U5) an die AF-1 (McEwan, 2004; Zhao *et al.*, 2002) sowie an die AF-2 (Dubbink *et al.*, 2006). Dieser Zusammenhang scheint allerdings unabhängig von der AR-Transaktivierung zu sein, da die kaum transaktivierende delta-AF 1-Mutante die LCoR-vermittelte Repression verstärkt.

Aus den Ergebnissen geht außerdem hervor, dass die AR-SUMOylierung, welche den AR stabilisiert, aber dessen Transaktivierung hindert (Poukka *et al.*, 2000), förderlich für die LCoR-Funktion ist. Alternativ kann spekuliert werden, dass LCoR indirekt mit dem AR über die K385/K518-bindenden CoR SMRT und Alien (Dotzlaw *et al.*, 2002) interagiert.

5.2) In LNCaP-Zellen hemmt Src-Signaling die R1881-verstärkte LCoR-Funktion

In LNCaP-Zellen erhöht R1881, wie auch in C4-2-Zellen, die LCoR Repression. Als weitere Gemeinsamkeit begünstigt Src diese auch in der Abwesenheit von R1881. Eventuell wird die LCoR-Repression durch R1881 oder Src, wie in C4-2-Zellen, durch Aufbau eines Komplexes aus AR und LCoR erhöht. Dabei spielt jedoch die Regulation der LCoR-Proteinmenge keine Rolle. Denn im Gegensatz zu C4-2-Zellen korreliert diese nicht mit der LCoR-Funktion.

Ein weiterer maßgeblicher Unterschied in LNCaP-Zellen besteht in der synergistischen LCoR Aktivierung durch R1881 und PP2, was durch die Experimente mit den entsprechenden Src-Mutanten unterstützt wird. So scheint in LNCaP-Zellen *Src-Signaling* die LCoR-Funktion in Gegenwart von Androgenen zu stören. Dies steht im Widerspruch zu C4-2-Zellen und wird eventuell durch Hemmung der LCoR-AR-Interaktion vermittelt. Ein Einfluss der R1881-induzierten AR-Translokation durch PP2 ist dabei ausgeschlossen (Dissertation J. Rödiger, 2012). Src könnte durch LCoR-Modifikationen ein Dissoziieren vom R1881-gebundenen AR bewirken, ähnlich der PKA-inhibierten SMRT-AR-Interaktion (Dotzlaw *et al.*, 2002).

Der Kontrast der Src-Wirkung auf LCoR in Gegenwart von R1881 von negativ in LNCaP- zu positiv in C4-2-Zellen könnte durch deren aktivere Src-Kinase oder andere Androgen-unabhängigkeit-assoziierte Kinasen bedingt sein. Die inkonsistente LCoR Regulation macht jedoch eine potenzielle PCa-Behandlung mit LCoR-basierten CoR-Peptiden schwer vorhersagbar, da die Tumore meist inhomogen bezüglich der Androgenabhängigkeit sind.

5.3) Optimierung der PAB-CoR-Peptid Isolierung für eine konstantere AR Inhibierung

LCoR kann durch viele Signalwege in seiner Aktivität reguliert werden. In den nahverwandten LNCaP- und C4-2-Zellen ist die LCoR Regulation durch die zwei untersuchten Einflüsse bereits sehr komplex und gegensätzlich. Außerdem wurde eine Transkriptions-aktivierende LCoR Wirkung in Abhängigkeit des Promotors gezeigt (Fernandes *et al.*, 2003).

Um diese Probleme zu umgehen, wurden die AR-spezifischen, zellpermeablen PAB-CoR-Peptide 9R-524 und 9R-513 genauer untersucht. Schließlich zeigt 9R-524 keine Abschwächung der AR-Bindung in Gegenwart aktiver PKA (Reeb und Gerlach *et al.*, 2011). Dies ist gegenüber zellulären CoR vorteilhaft, da PKA den AR vermutlich über Dissoziation des CoR SMRT androgenunabhängig aktiviert (Dotzlaw *et al.*, 2002; Sadar *et al.*, 1999).

Zunächst war eine Optimierung der PAB-CoR-Peptid Isolierung aus *E. coli* notwendig. Nach wenig erfolgreichen Änderungen der GST-Affinitätsaufreinigung konnte durch die Umstellung zum His-Tag die Ausbeute der halb so großen Fusionsproteine deutlich verbessert werden. Neben der stärkeren Expression wurde auch eine effizientere Affinitätsaufreinigung etabliert. Da His-Proteine im Gegensatz zu GST-Fusionen auch unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt werden können (Ahmad *et al.*, 2003), werden potenziell aggregierte und in *inclusion bodies* akkumulierte, rekombinante Proteine stärker extrahiert. Um die wirksame Konzentration und somit unspezifischen Effekte zu verringern, wurde die PTD 9R durch TAT mit dem Ziel einer effizienteren Proteintransduktion ersetzt, da TAT gehäufiger zu erfolgreichen Anwendungen führte (Heitz *et al.*, 2009; Patel *et al.*, 2007). Weiterhin ist TAT weniger zytotoxisch als Polyarginin-basierte PTD (Jones *et al.*, 2005). Zudem ist eine geringere Affinität durch die weniger basische AS-Sequenz zur Zellmembran gegenüber 9R-524 (Reeb und Gerlach *et al.*, 2011) zu erwarten, wodurch der Transport in die Zelle begünstigt wäre.

Neben den niedrigeren theoretischen Instabilitätsindexen für die TAT-Fusionen ist auch die geschätzte Halbwertszeit in Säugerzellen (Expasy/Protparam) mit 30 h für die TAT-Peptide gegenüber 3,5 h für die 9R-Fusionen wesentlich höher. Der drastische Unterschied verdeutlicht den entscheidenden Einfluss der nur kurzen PTD auf die PAB-CoR-Peptidstabilität und den großen Vorteil der eingesetzten TAT-Domäne. Neben der geringeren mit Proteinabbau assoziierten AS-Folge werden die Peptide eventuell auch geschützt, indem eine günstigere Konformation gefördert wird und für den Abbau prädestinierte Motive nicht exponiert werden.

Ein großes Problem besteht jedoch darin, dass die Proteine während der Dialyse präzipitieren. Dies geschieht vermutlich durch Salzbrücken zwischen dem His-Tag und negativ-geladenen AS (Warwicker und O'Connor, 1995), welche durch die anfangs hohe Imidzolkonzentration kompetitiv verhindert werden (Hamilton *et al.*, 2003).

Insgesamt konnte gegenüber der GST-vermittelten Aufreinigung über die Umstellung zum His-Tag dennoch eine ca. fünffach höhere Aubeute erzielt werden mit ca. 3 mg 9R-524 bzw. TAT-524 je l Bakterienkultur.

5.4) Erhöhung der PAB-CoR-Peptid Löslichkeit

Trotz Vorliegen physiologischer Bedingungen, wie z. B. durch den bisher verwendeten Dialysepuffer (DP) PBS, können Proteine aufgrund gestörter Sekundär- und Tertiärstrukturen präzipitieren. Daher wurde der Einfluss zehn verschiedener DP als Lösungsmittel der Peptide getestet, wonach für das Kontrollpeptid TAT das Reduktionsmittel DTT vorteilhaft ist. Demzufolge werden vermutlich Thiol-Gruppen, welche in den getesteten Peptiden TAT und TAT-524 durch jeweils zwei Cysteine vorkommen könnten, vor Oxidation geschützt und somit wahrscheinlich eine intakte Tertiärstruktur gewährleistet. Auch ZnCl hilft, TAT zu stabilisieren, obwohl *in silico* keine Zn-Finger bei TAT und TAT-524 ausgebildet werden (Bachelorarbeit K. Schärlich, 2012; ExPASy).

Für TAT-524 scheint der anti-oxidative Schutz der Thiol-Gruppen sowie der Zusatz von ZnCl keine Rolle für dessen Löslichkeit zu spielen. DTT verringert sogar etwas die Ausbeute an löslichem TAT-524. Eventuell ist im Gegensatz zu TAT alleine die Ausbildung einer Disulfidbrücke für eine intakte Tertiärstruktur notwendig. Vorstellbar ist, dass sich diese hydrophobe Bindung zwischen den Cysteinen, eins mitten im SUMO-Peptid und das zweite kurz vor der PA-Sequenz, im Inneren des gefalteten TAT-524 Peptids befindet. Diese Disulfidbrücke könnte auf eine sehr günstige Konformation hindeuten. So wird eventuell das PA nach außen exponiert, entsprechend der Annahme von Hoppe-Seyler und Butz (2000), wobei neben TrxA auch SUMO als Gerüstprotein dient (Roisin *et al.*, 2004). Darüber hinaus verbessert eine höhere NaCl-Konzentration die TAT-524 Ausbeute enorm, indem vermutlich die Salzionen das verschwindende Imidazol in seiner Funktion, Aggregation zu vermeiden, ersetzen (Bachelorarbeit K. Schärlich, 2012). Weiterhin ist TRIS (DP 9) für beide Peptide besser geeignet als Natriumphosphat, wobei eventuell die höhere Pufferkapazität bei pH 8,0 aufgrund des pKs-Werts von 8,1 gegenüber 7,5 von Natriumphosphat entscheidend ist.

Schließlich wurde trotz Verlust durch Proteinabbau sowie Präzipitation während der Dialyse eine mehr als zweifach effizientere Ausbeute von löslichem His-TAT-524 mit 1,28 mg/l Kultur gegenüber dem GST-aufgereinigten 9R-524 erzielt. Gleichzeitig ist die Löslichkeit von TAT-524 geringer als bei TAT. Dies könnte am höheren isoelektrischen Punkt von TAT-524 (6,22) bedingt sein, welcher näher am pH-Wert von DP 9 (8,0) liegt, verglichen zu TAT (5,81) (Expasy/Protparam).

5.5) TAT-513 hemmt die LNCaP-Zellproliferation effizienter und spezifischer als TAT-524 und führt in LNCaP-Zellen neben dem G1-Arrest zur Apoptose-Induktion

Die TAT-fusionierten PAB-CoR-Peptide haben einen starken inhibitorischen Effekt auf das Wachstum der LNCaP-Zellen im nanomolaren Bereich. Währenddessen ist die inhibierende Wirkung von 55 nM TAT (im Folgenden definiert als mittlerer nanomolarer Bereich) und zu einem geringeren Maß von 36 nM TAT höchstwahrscheinlich auf die Zytotoxizität von DP 9 zurückzuführen. Durch Beteiligung des PA 524 kommt es in beiden Konzentrationen zum vollständigen Absterben der LNCaP-Zellen. Weitaus effektiver ist TAT-513, welches zu einer ebenso starken Inhibierung führt, jedoch bei zweifach reduzierter Konzentration (18 nM, definiert als niederer nanomolarer Bereich). TAT-513 ist dabei wesentlich spezifischer als TAT-524. Hinsichtlich der Konzentration ist TAT-513 auch deutlich effizienter als der in der PCa-Therapie eingesetzte Antagonist Cas. So ist für den gleichen Effekt bei TAT-513 eine zehnfach geringere Konzentration zur Hemmung der PCa-Zellproliferation ausreichend.

Als weiterer Vergleich konnte das Wachstum der PCa-Zelllinie SW480 durch 0,35 µM eines TAT-p53-Fusionsproteins halbiert werden (Yu *et al.*, 2009). Die TAT-haltigen PAB-CoR-Peptide und insbesondere TAT-513 stellen daher mit einer ca. zehn- bis 30-fach geringeren notwendigen Konzentration sehr effiziente und vielversprechende therapeutische Peptide dar, welche daher auch sehr geringe Nebenwirkungen haben könnten. Es wird selbst ca. zehnfach weniger Peptid, verglichen zur vorherigen 9R-Fusion, benötigt. Dies ist eventuell auf eine höhere Transduktionsfähigkeit durch TAT zurückzuführen, welche für den Transport adenoviraler Partikel gilt (Nigatu *et al.*, 2013). Eine Erklärung für die höhere Effizienz der TAT- gegenüber der 9R-Fusionen könnte auch die *in silico* nachgewiesene sowie bei TAT-513 die während des Frierens und Tauens höhere Stabilität sein.

Als wahrscheinliche Ursachen der negativen Wachstumsregulation durch TAT-513 im niederen nanomolaren Bereich konnten ein G1-Arrest sowie eine Apoptose-Induktion

identifiziert werden. Letzteres ist eventuell durch die Reduktion der AR-Proteinmenge bedingt (Liao *et al.*, 2005). Dabei kann jedoch Nekrose nicht ausgeschlossen werden, da die PI-durchlässigen Zellen bereits durch das Kontrollpeptid und somit vermutlich AR-unspezifisch und wahrscheinlich durch DP 9 erhöht sind.

TAT-524 hat währenddessen keinen Einfluss auf den Apoptosemarker, verglichen zur unbehandelten Kontrolle. Neben einer mutmaßlichen Nekrose-Induktion aufgrund der starken PI-Färbung reduziert TAT-524 im mittleren nanomolaren Bereich die LNCaP-Zellzahl wahrscheinlich aufgrund eines G1-Arrests. Dieser ist gegenüber TAT-513 etwas stärker. Bei beiden PAB-CoR-Peptiden scheint der G1-Arrest nicht durch die Induktion von zellulärer Seneszenz, welche irreversibel ist, hervorgerufen zu sein.

5.6) TAT-513 reguliert in LNCaP-Zellen, spezifischer als TAT-524, wichtige Zellzyklusfaktoren vermutlich durch Inhibierung des ARs

Zur Aufklärung der molekularen Mechanismen wurden der AR sowie relevante Zellzyklusproteine per Westernblot-Analysen in TAT-513 und TAT-524 behandelten LNCaP-Zellen untersucht. Als Ursache des PA-spezifischen Zellzyklusarrests durch TAT-513 konnte eine pRB-Dephosphorylierung, das heißt eine pRB-Aktivierung als Resultat der Cyclin D1 Verminderung sowie p27 Steigerung festgestellt werden. Cyclin D1 und p27 werden ebenso durch TAT-524 reguliert. Diese Änderungen sind vermutlich jeweils eine Folge der negativen Regulation der AR-Transaktivierung. Ferner wird die PA-spezifisch erhöhte Apoposerate durch TAT-513 höchstwahrscheinlich durch die beinahe zweifach verringerte AR-Proteinmenge verursacht. Hingegen reduziert TAT-524 das AR-Protein völlig ohne Beteiligung des PA 524.

Im Fall von TAT-513 im niederen nanomolaren Bereich könnte der AR durch Bindung des PA 513 u. a. aufgrund von proteasomalem Abbau destabilisiert werden, eventuell ausgelöst durch Inhibierung der Assoziation mit schützenden HSP (Hessenkemper und Baniahmad, 2013; Basak *et al.*, 2008). Die Verringerung des AR-Proteins durch AR Degradierung ist als Mechanismus wahrscheinlicher als eine Hemmung der AR-Expression, da das PA 513 nachweislich mit dem AR interagiert (Diplomarbeit I. Prade, 2008). Die Wirkungsweise durch TAT-524 im mittleren nanomolaren Bereich besteht möglicherweise in einer hohen intrazellulären TAT-524 Konzentration infolge einer effektiven Peptidtransduktion. So könnte das Kontrollpeptid den AR vermindern, indem SUMO_{G97A} aufgrund der hohen Konzentration

trotz fehlender Konjugationsfunktion mit Proteinen interagiert. Durch die SUMOylierungs-unabhängige Transrepressions-Funktion (Reeb und Gerlach *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2003) könnte SUMO_{G97A} verschiedene TF, darunter jene für die AR-Expression, inhibieren. Auf diese Weise könnten auch die vermutlich LBD-negativen AR-Isoformen vorrangig PA-unabhängig gehemmt werden.

Das PA 524 scheint den AR bzw. dessen Isoformen auf Ebene der Proteinmenge nicht maßgeblich zu targetieren. Dennoch trägt es entscheidend zur PSA Verminderung bei. Dies lässt auf eine spezifische Wirkung von TAT-524 auf Ebene der AR-Transaktivierung schließen. Tatsächlich konnte eine negative Regulation der transkriptionellen AR-Aktivität durch 9R-524 sowie 9R-513 nach Transfektion der Expressionsplasmide in Reporterassays nachgewiesen werden. Das PA 513 ist währenddessen deutlich an der Verringerung von PSA sowie auch der AR-Isoformen beteiligt. Der spezifische negative Einfluss von TAT-513 auf die Menge der AR-Splicevarianten könnte die Transrepression der entsprechenden Mutante, gezeigt anhand von 9R-513 im Reporterassay, bewirken. Hingegen reguliert TAT-524 die AR-Isoformen PA-unspezifischer und scheinbar nur auf Ebene der Proteinmenge, ohne jedoch deren Funktion zu hemmen. Die negative Beeinflussung der konstitutiven Aktivität der AR-Isoformen ist sehr aussichtsreich, um das Wachstum von CRPC zu unterdrücken (Haile und Sadar, 2011). So vermitteln diese AR-Splicevarianten die Resistenz gegenüber dem neuen Antagonisten MDV3100 (Li *et al.*, 2013). Daher stellt TAT-513 einen vielversprechenden AR-CoR zur Inhibierung des kastrationsresistenten PCa-Wachstums dar.

Die starke negative Regulation der Cyclin D1-Proteinmenge durch beide PAB-CoR-Peptide, welche bei TAT-513 spezifisch durch das PA 513 hervorgerufen wird, ist mit hoher Wahrscheinlichkeit beteiligt an der gehemmten LNCaP-Zellproliferation. Für die Cyclin D1 Verminderung könnte die mutmaßliche AR Destabilisierung verantwortlich sein, da der aktivierte AR im Cytoplasma über mTOR zur Cyclin D1 Akkumulation führt (Balk und Knudsen, 2008). Der PA-spezifische Effekt von TAT-524 auf Cyclin D1 könnte hingegen durch direkte Interaktion zwischen dem PA 524 und Cyclin D1 bzw.-assoziierten Signalwegen beruhen. Dies verdeutlicht, dass TAT-524 weniger zielgerichtete Effekte bewirkt und vermutlich eine Vielzahl von Proteinen, unabhängig von einer AR-Targetierung, reguliert.

Es kann angenommen werden, dass die deutliche TAT-513-vermittelte Reduktion von p21, welches in LNCaP-Zellen als Tumorsuppressor wirkt (Dissertation J. Rödiger, 2012; Lincova *et al.*, 2009), auf Ebene der Genexpression erfolgt. Denn die Verminderung könnte das Ergebnis

des gleichermaßen PA-abhängig verringerten AR-Proteins bzw. dessen Funktion sein, da p21 ein direktes AR-Zielgen ist (Lu *et al.*, 1999). Durch TAT-524 besteht nur eine geringfügige sowie PA-unabhängige negative p21 Regulation, welche eventuell durch den ebenfalls alleinig von TAT verminderten AR erfolgt.

Bezüglich einer möglichen p21-vermittelten Apoptose-Induktion (Srivastava *et al.*, 2007) durch TAT-513 könnte p21 direkt anschließend abgebaut werden. Ein ähnliches Phänomen besteht in seneszenten LNCaP-Zellen. Dabei fällt nach anfänglicher p21 Akkumulation zur Induktion das Level bei Erreichen des Stadiums ab, während p16 für die Aufrechterhaltung sorgt (Dissertation J.Rödiger 2012; Stein *et al.*, 1999). Darüber hinaus ist bei der Apoptose-Induktion durch TAT-513 auch eine Reduktion des anti-apoptotischen Proteins Bcl-xL denkbar, ähnlich der Regulation durch *knockdown* des ARs (Liao *et al.*, 2005).

Eine weitere PA-abhängige Wirkung von TAT-513 im niederen nanomolaren Bereich besteht in der Steigerung des Tumorsuppressors p27, welche ebenfalls durch den spezifisch gehemmten AR begründet sein kann. Denn der aktivierte AR führt zur p27 Degradierung (Balk und Knudsen, 2008). Die p27 Erhöhung trägt durch Blockierung der Cyclin (u. a. Cyclin D1)-abhängigen Kinasen zusammen mit der Cyclin D1 Verminderung höchstwahrscheinlich entscheidend zum Zellzyklusarrest bei. TAT zeigt im mittleren nanomolaren Bereich ebenfalls die negative Korrelation zwischen AR und p27, wobei TAT-524 keinen weiteren Effekt hat.

Darüber hinaus wird Src durch beide Peptide ohne Einfluss der PA dephosphoryliert und somit vermutlich inaktiviert (nicht gezeigt). Diese nicht durch die AR Hemmung vermittelte Src-Inhibierung könnte zur unspezifischen Wachstumshemmung, welche auch geringfügig durch das Kontrollpeptid im niederen nanomolaren Bereich verursacht wird, beitragen.

TAT-513 vermindert des Weiteren die pRB-Phosphorylierung, was ein Indiz für die Aktivierung dieses Tumorsuppressors ist. Dies könnte indirekt durch die AR Reduktion erfolgen. Denn der AR inaktiviert pRB, indem er über Akkumulation von Cyclin D1 die CDK 4-Aktivität erhöht und somit pRB phosphoryliert. Außerdem führt auch die AR-induzierte p27 Degradierung zur Cyclin E/CDK 2-abhängigen Inaktivierung von pRB (Balk und Knudsen, 2008). Entsprechend der indirekten pRB Regulation durch die übergeordneten AR-Zielproteine Cyclin D1 und p27 ist der Effekt von TAT-513 auf pRB vergleichsweise geringer. Schließlich führt vermutlich die pRB-Aktivierung zum verlangsamten Zellzyklus. Bei TAT-524 ist hingegen von einer pRB-Inaktivierung auszugehen. Eventuell wird dabei der G1-Arrest

aufgrund der Cyclin D1 Reduktion sowie der Erhöhung von p27 durch andere *Pocket* Proteine wie p130 und p107 vermittelt.

Die Wirkmechanismen der G1-Arrest-vermittelten Wachstumshemmung durch die PAB-CoR-Peptide könnten demnach ähnlich sein. Sie sind allerdings in ihrer Spezifität unterschiedlich. So wird das Wachstum der LNCaP-Zellen durch die Regulation der Zellzyklus-Proteine, welche bei TAT-513 teilweise stärker und vor allem PA-spezifisch ist, gehemmt. Dabei werden, ausgehend von der Verminderung und Inhibierung des AR Zielmoleküls, die Mengen von Cyclin D1 sowie p21 negativ und p27 positiv spezifisch reguliert (Abb. 6.1). Das heißt, die anderen Peptidomänen, außer PA 513, haben bei dieser Konzentration keinen Einfluss auf die Zellzyklusproteine oder das in DP 9 enthaltene Salz bzw. Glycerin ist ausreichend gering konzentriert. Dies gibt Hinweise auf eine spezifische sowie hochaffine AR-Bindung durch das PA 513 im niederen nanomolaren Bereich. Folglich sollte für eine möglichst spezifische und somit nebenwirkungsarme Inhibierung des PCa-Wachstums durch TAT-513 eine maximale Konzentration von 18 nM bzw. 10 % Volumenanteil eingesetzt werden aufgrund der Wirkung des Kontrollpeptids auf die AR-Isoformen, PSA sowie pRB. Neben der höheren Spezifität reduziert TAT-513 außerdem die Proteinmengen von PSA sowie p21 1,5- bis zweifach stärker. Darüber hinaus scheinen die PAB-CoR-Peptide die AR-Aktivität auf verschiedenen Ebenen zu hemmen. So vermittelt TAT-513 vermutlich den Abbau des AR-Proteins. Währenddessen fungieren beide, das heißt TAT-513 eventuell zusätzlich, als AR-CoR, indem sie die AR-Transaktivierung hemmen. Dabei sind verschiedene Mechanismen denkbar. Außer der Rekrutierung von HDAC und weiteren CoR, kann die AR N-C-Interaktion, -Translokation sowie -DNA- und -CoA-Bindung unterdrückt werden (Wang *et al.*, 2005). Die Degradierung des ARs als Strategie für dessen Inaktivierung ist dabei zielsicherer, da viele Proliferations-fördernde Funktionen des ARs nicht nur über direkte Transkriptionsaktivierung, sondern auch über nicht-genomische Effekte vermittelt werden (Yuan *et al.*, 2013). Als weiterer Vorteil induziert der AR Abbau Apoptose in LNCaP-Zellen (Liao *et al.*, 2005).

5.7) TAT-513 inhibiert das Wachstum der C4-2-Zellen auch effizient und ebenfalls in Abhängigkeit des ARs, während TAT-524 unspezifisch wirkt

Das Wachstum der von LNCaP-Zellen abstammenden, androgenunabhängigen C4-2-Zellen wird nach drei Tagen durch TAT-524 inhibiert, ähnlich wie das der LNCaP-Zellen. Die Proliferation wird ebenfalls ohne Apoptose-Induktion reduziert. Dem gegenüber hemmt

TAT-513 stärker und auch ähnlich effektiv wie in LNCaP-Zellen das Wachstum der C4-2-Zellen, allerdings auch ohne Beeinflussung der Apoptoserate. Die Mechanismen der Proliferationshemmung in C4-2-Zellen lassen sich möglicherweise auf einen Zellzyklus-Arrest zurückführen. Offenbar besteht in den androgenunabhängigen Zellen eine Apoptose-resistenz gegenüber TAT-513, eventuell durch einen fehlenden AR Abbau. Daher scheinen nicht-letale Prozesse wie z. B. ein G1-Arrest eine Rolle zu spielen, bei welchem wie bei LNCaP-Zellen, interessanterweise keine zelluläre Seneszenz-Marker exprimiert werden.

Der anscheinende Wechsel zur mäßigeren wachstumshemmenden Wirkungsweise in androgenunabhängigen gegenüber -abhängigen Zellen könnte langfristig zur Überwindung der Proliferationshemmung führen, indem die PCa-Zellen vermehrt überleben und eventuell zur Zellteilung reaktiviert werden. Für die Apoptose-Resistenz können womöglich, falls TAT-513 dennoch das AR-Protein verringert, die in CRPC höhere Aktivität onkogener Signalwege, wie z. B. der *Insulin-like*-, Keratinozyten- und Epidermalen-Wachstumsfaktoren (Karantanos *et al.*, 2013), bzw. die Herunterregulation wichtiger Tumorsuppressoren verantwortlich sein. Dabei kann das für die Apoptose-Induktion entscheidende p53 ausgeschlossen werden, da dieses bei C4-2-Zellen funktionell ist (Liu *et al.*, 2013b). Hingegen ist das Proto-Onkogen Myb, welches Zellteilung sowie –Überleben durch Induktion von Bcl-xL fördert, in C4-2-Zellen überexprimiert und es scheint an der Apoptoseresistenz gegenüber der Androgendepletion beteiligt zu sein (Srivastava *et al.*, 2012). Dementsprechend könnte dieser Mechanismus zur Überwindung der ADT auch die Funktion von TAT-513 beeinträchtigen. Es könnte außerdem das in C4-2 gegenüber LNCaP-Zellen verstärkte Src-Signaling, welches anhand des Fos-regulierten Reportergens gezeigt wurde, für die Apoptoseresistenz verantwortlich sein (Chang *et al.*, 2007). Andererseits ist auch die erhöhte R1881-Induktion der AR-Isoformen als Grund der mildereren Wirkungsweise von TAT-513 vorstellbar. Schließlich aktivieren diese ein transkriptionelles Profil mit überwiegend Zellzyklus-fördernden Genen, wohingegen der f.l. AR Gene für Differenzierung, Makromolekularsynthese sowie Metabolismus induziert (Hu *et al.*, 2012). Dennoch hemmt TAT-513 die C4-2-Zellproliferation ähnlich effizient wie die der LNCaP-Zellen. So ist bei einer zeitlich begrenzten Behandlung nicht von einer schlechteren Wirksamkeit in androgenunabhängigen PCa-Zellen auszugehen.

Sehr vielversprechend ist, dass die ca. zweifache Proliferationshemmung durch TAT-513 in LNCaP- und C4-2-Zellen nach 72 h scheinbar ausschließlich über die Hemmung des

Zielmoleküls AR geschieht, da TAT-513 keinen Effekt in den AR-negativen PC3-Zellen hat. Demnach könnte die Wachstumshemmung alleinig durch spezifische AR-Bindung des PA 513 erfolgen. Somit werden offensichtlich gezielt AR-positive PCa-Zellen durch TAT-513 gehemmt. Demgegenüber steht TAT-524, welches die PC3-Zellzahl völlig ohne Beteiligung des PA halbiert. Dies unterstützt die Vermutung, dass das PA 524 neben dem AR weitere Proteine bindet. Der stärkere TAT-524 Effekt gegenüber den PCa-Zellen beruht eventuell auf Hemmung der in den PC3-Zellen vermehrten, kompensatorischen Signalwege, welche in LNCaP- und C4-2-Zellen weniger relevant sind.

5.8) TAT-513 zeigt das größere Potenzial zur AR Inhibierung, wobei AR-T877A durch beide PAB-CoR-Peptide vor allem in Gegenwart von R1881 gehemmt wird

GST-Pulldowns deuten an, dass ähnlich wie LCoR auch der synthetische CoR 9R-524 die AR-T877A-Mutante in Gegenwart von R1881 stärker bindet als ohne Hormon. Dies könnte für gleiche AR-Interaktionsmotive sprechen. Allerdings liegt keine signifikante Ähnlichkeit der AS-Sequenzen vor (NCBI/Proteinblast). Dennoch wird aufgrund der gleichermaßen Androgen-verstärkten Interaktion eventuell die gleiche AR-Region gebunden, was auf die AR-DBD (Asim *et al.*, 2011) schließen lässt. Eine Analyse mittels AR-Deletionen ergab tatsächlich, dass 9R-524 neben der AR-LBD auch die -DBD bindet. Die Region 39-328 im N-Terminus ist des Weiteren essentiell (Masterarbeit A. Ghanem, 2012) und wahrscheinlich ebenso die LBD aufgrund fehlender Inhibierung der entsprechenden Mutante. Es scheint, dass weniger eine eingegrenzte Region, sondern vielmehr die Oberfläche des gefalteten AR-Proteins durch die PAB-CoR-Peptide in Abhängigkeit der Liganden-induzierten Konformation gebunden wird. Die LBD spielt hingegen bei 9R-513 offenbar keine Rolle für die Bindung.

Die stärkere AR-Bindung von 9R-524 in Anwesenheit von Androgenen, welche sich in der Hemmung der AR-T877A-Transaktivierung widerspiegelt und somit auch für 9R-513 angenommen werden kann, könnte vorteilhaft für eine zukünftige Therapie sein. Die bisherige ADT und auch Antagonisten wären eventuell überflüssig, wodurch möglicherweise Kastrations- sowie Antagonistresistenzen überwunden bzw. vermieden werden könnten. Es kann vermutet werden, dass der neue AR-CoR TAT-513 vorwiegend mit physiologischen Androgenkonzentrationen, entsprechend 10^{-10} bis 10^{-8} M R1881, wirksam ist. So wäre dessen Einsatz ohne kombinatorische Behandlung und folglich weniger Nebeneffekten sehr vielversprechend. Insbesondere für Tumorrezidive könnte dies eine potenzielle Alternative

darstellen. Denn das durch die Therapie entstandene Defizit an funktionellen CoR (Waltering *et al.*, 2012; Godoy *et al.*, 2012; Eisold *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2008; Chmelar *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2004; Dotzlaw *et al.*, 2002) könnte durch das Einschleusen des zellpermeablen CoR-Peptids kompensiert werden. Dadurch wird ein neuer Mechanismus der AR Hemmung umgesetzt. Die Resistenzen der vorherigen Präparate könnten überwunden werden. Eine alternierende Behandlung z. B. mit dem Antagonisten MDV3100, welcher die AR-Translokation blockiert (Yuan *et al.*, 2013), könnte eine Tumorprogression langfristig verhindern. So kann jeweils auf einen anderen molekularen Mechanismus zurückgegriffen werden, was eine dauerhafte Hemmung des PCa-Wachstums ermöglichen könnte.

Interessant ist weiterhin, dass andererseits die stärkste spezifische AR-Bindung von 9R-524, das heißt relativ zum Kontrollpeptid, mit dem Antagonisten OH-F erreicht wird. Diese Kombination verursacht ebenfalls die stärkste Hemmung der PSA-Expression nach Behandlung der LNCaP-Zellen (Reeb und Gerlach *et al.*, 2011). So kann der AR-T877A-aktivierende Antagonist OH-F (Veldscholte *et al.*, 1992) durch 9R-524 vermutlich wieder antagonistisch wirken, wodurch eventuell ein wesentlicher Mechanismus der Progression zum therapieresistenten Wachstum ausgeschaltet wird.

9R-513 ist für die Hemmung der AR-Transaktivierung besonders effektiv und zeigt im Vergleich zu 9R-524 einen größeren Wirkungsbereich auf den wtAR sowie AR-T877A hinsichtlich der Liganden. Dies könnte vielversprechend für die Hemmung des androgenunabhängig aktivierten AR sein, dessen Ligandenspezifität breiter ist. 9R-513 inhibiert im Gegensatz zu 9R-524 auch die konstitutiv-aktive AR-deltaLBD-Mutante. Dies ist besonders bedeutsam, da die Mutante maßgeblich zur Androgenunabhängigkeit beiträgt (Haile und Sadar, 2011) und ausreichend für die Resistenz gegenüber MDV3001 ist (Li *et al.*, 2013). Daher könnte 9R-513 einen weiteren zentralen Mechanismus für die Entstehung von Resistenzen überwinden.

In dieser Hinsicht ist 9R-513 ebenfalls vielversprechend aufgrund der ähnlich starken Hemmung der AR-Transaktivierung in Anwesenheit aktiver PKA, welche eine massive Steigerung der AR-Aktivität bewirkt. Letzteres steht im Einklang mit der PKA-vermittelten androgenunabhängigen AR Aktivierung und der daraus folgenden PCa-Progression (Sarwar *et al.*, 2013; Sadar *et al.*, 1999). Es könnte sogar sein, dass 9R-513 durch die Hemmung der PKA-induzierten AR-Transaktivierung einen weiteren Mechanismus der Tumorprogression unterdrückt. Denn einige PKA-Untereinheiten gehören zu den AR-Zielgenen (Kvissel *et al.*, 2007). Gleichzeitig reicht der PKA-Signalweg allein aus, um die neuroendokrine

Differenzierung von PCa-Zellen zu bewirken. Diese vermitteln Proliferationssignale, wodurch sie androgenunabhängiges PCa-Wachstum parakrin fördern (Deeble *et al.*, 2007).

Mit der Unterbindung dieser positiven Rückkopplung des PKA-aktivierten AR könnte 9R-513 zusätzlich eine erneute Hemmung des fortgeschrittenen Tumorwachstums erreichen. Es ist daher gegenüber endogenen CoR ein großer Vorteil, dass 9R-513 nicht wie SMRT durch die PKA (Dotzlaw *et al.*, 2002) oder wie LCoR durch Src in Gegenwart von R1881 in LNCaP-Zellen negativ beeinflusst wird. Demnach stellt TAT-513, sowohl gegenüber potenziellen LCoR-basierten CoR als auch TAT-524, ein aussichtsreiches Peptid zur beständigen AR Inhibierung, vermutlich unabhängig vom Status der Androgenabhängigkeit, dar. Nicht zuletzt ist TAT-513 durch den Verzicht des bakteriellen Gerüstproteins TrxA gegenüber TAT-524 sehr erfolgsversprechend, wodurch das Risiko von Immunreaktionen verringert ist.

5.9) Aussicht

Trotz der effizienten Wirkung von TAT-513 könnte durch Austausch der Transrepressionsdomäne eine erhebliche Optimierung erreicht werden. Schließlich ist der apoptotische Effekt in LNCaP-Zellen gegenüber TAT wesentlich stärker als verglichen zur unbehandelten Kontrolle, so dass ein hohes Potenzial des PA 513 besteht. Ein Ersatz könnte die *Sin interacting Domain* (SID) des DNA-bindenden Proteins MAD1 sein, welches nach Fusion an TF deren Aktivität hemmt (Ayer *et al.*, 1996). Dabei könnte die geringe Größe von nur 35 AS vorteilhaft für die Spezifität des synthetischen CoR sein. Um des Weiteren das Potenzial des PA 513 zu nutzen, sollte auch DP 9 ersetzt werden. Dessen zytotoxische Wirkung beruht vermutlich auf Glyzerin (7 %). Um die Stabilität während des Frierens und Tauens zu gewährleisten, wäre eine Mischung von Kryoprotektoren effektiver und weniger zellschädlich als einzelne Substanzen. Z. B. wird Sukrose mit Propylenglykol zur Oocyten-Kryokonservierung kombiniert (Dike *et al.*, 2013).

Nach dieser ersten Analyse der PAB-CoR Wirkung ist es wichtig, die Mechanismen auch in C4-2- und PC3-Zellen zu identifizieren. Somit sollten die Effekte nachgewiesen werden, die ausschließlich auf Targetierung des ARs beruhen. Aufschluss zur Spezifität könnte auch eine Massenspektrometrie der interagierenden Proteine nach TAT-513-Pulldown geben. Darüber hinaus sollte die vermutete AR Degradierung als Auslöser der Apoptose in LNCaP-Zellen, anhand eines Proteasominhibitors, verifiziert werden. Bezüglich der Apoptose-Resistenz in C4-2-Zellen ist es wichtig, diese auf einen fehlenden AR Abbau als Ursache zu überprüfen.

Um zusätzlich abzusichern, dass TAT-513 den AR stabil inhibiert, sollte der Einfluss weiterer, in CRPC verstärkter Signalwege, wie Src, die HER2/neu Rezeptor-Tyrosinkinase, EGFR oder IGFR (McCall *et al.*, 2008; Kaarbo *et al.*, 2007), untersucht werden.

Für die weitere Aufklärung der molekularen Mechanismen ist es sinnvoll, anhand einer GFP-Fusion die AR-Lokalisation stundenweise in lebenden Zellen nach TAT-513 Behandlung zu ermitteln. Dies würde Aufschluss geben, ob die inhibierte AR-Transaktivierung neben der AR Degradierung überwiegend durch Translokationshemmung oder im Zellkern vermittelt wird. Demnach wäre auch die Untersuchung der AR-Chromatinbindung anhand von ChIP sinnvoll. In dieser Hinsicht ist interessant, ob das Chromatin lokal kondensiert wird. Dabei wäre die Analyse der Modifikationen via ChIP sowie der DNA-Methylierung via Bisulfit-Sequenzierung, welche eine mitotisch stabile Genrepression andeutet, aufschlussreich. Um den Status der AR-Transaktivierung besser zu beurteilen als durch PSA, welches kein aussagekräftiger Marker ist, sollten mehrere AR-Zielgene untersucht werden (Laxman *et al.*, 2008). Dabei sind besonders Zellzyklus-assoziierte Gene relevant, wie z. B. RAB4A, ein Ras Onkoprotein (Taplin, 2007); TMPRSS2; die onkogene PI3K-Untereinheit p58 (Balk und Knudsen, 2008); das mutmaßliche Onkogen TSPY und die Metastasen-fördernden Gene AGR 2 sowie MMP 2 und MMP 9 (Hara *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008).

Dementsprechend sollte auch der TAT-513 Einfluss auf die Invasion, vor allem der entsprechend aggressiveren androgenunabhängigen PCa-Zellen (Bonaccorsi *et al.*, 2003) analysiert werden. Um schließlich Einblick in die *in vivo* Funktion zu erhalten, sollten PCa-Xenografts in immundefizienten Mäusen durch tumornahe Injektion (Bowne *et al.*, 2007) behandelt werden unter Analyse der AR-Aktivität bzw. der Zellzyklusproteine. Zusätzlich wäre der Einsatz im immunkompetenten PCa-Modell, den TRAMP-Mäusen, sehr wichtig.

Sehr bedeutsam ist die spezifische Targetierung von PCa-Zellen, da zellpermeable Peptide gleichmäßig *in vivo* verteilt sind (Wadia und Dowdy, 2005). Zur Vermeidung des Einflusses anderer androgenregulierter Gewebe, wie sie durch die Antagonisten in Form von Muskelabbau, Gynäkomastie und Depressionen auftreten, ist die Fusion mit einem Liganden für PCa-spezifische Proteine sinnvoll. So wird das Transmembranprotein Tomoregulin nur in Prostata und Gehirn exprimiert. Aufgrund der erhöhten Expression in PCa-Zellen ist es ein vielversprechendes Target (Zhao *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2005). Als weiteres PCa-spezifisches Target wäre außerdem das *Prostate specific Membrane Antigen* (PSMA) denkbar (Fortmüller *et al.*, 2011).

6) Schlussfolgerung

Ziel dieser Arbeit war die Umsetzung eines neuen Ansatzes zur Hemmung der Proliferation von PCa-Zellen. Dabei sollten zellpermeable, AR-spezifische CoR-Peptide einen wesentlichen Mechanismus der PCa-Progression überwinden, indem diese vektorfrei den Mangel an funktionellen AR-CoR vorbeugen bzw. ausgleichen sollten. Der zunächst untersuchte humane CoR LCoR als Basis neuer potenzieller AR-spezifischer CoR stellte sich dabei als ungeeignet heraus. Grund dafür ist die sehr komplexe und gegensätzliche Regulation durch das Zusammenspiel von Androgenen und *Src-Signaling*. Zur konstanteren AR Inhibierung, welche unabhängiger vom Status der Androgenabhängigkeit sein sollte, wurden so die zuvor generierten neuartigen, zellpermeablen PAB-CoR-Peptide weiterentwickelt. Die Herstellung sowie Löslichkeit unter physiologischen Bedingungen wurden optimiert, so dass schließlich das Wachstum von PCa-Zellen effektiv im nanomolaren Bereich inhibiert werden konnte.

9R-513 zeigt in Transfektionsassays keine negative Beeinflussung durch die mit Androgenunabhängigkeit-assoziierte PKA und ist außerdem besonders vielversprechend durch die effiziente Hemmung der konstitutiv-aktiven LBD-negativen AR-Isoformen. Die verstärkte AR-Interaktion und -Inhibierung beider PAB-CoR-Peptide in Gegenwart von R1881 stellt einen günstigen Mechanismus dar, welcher möglicherweise keine ADT oder AR-Antagonisten erfordert. 9R-513 ist dabei als AR-CoR wirksamer, da es ein größeres Wirkspektrum hinsichtlich der AR-Liganden zeigt, was ebenfalls sehr aussichtsreich bei der Hemmung mutierter AR-Proteine sein kann, deren Ligandenspezifität breiter ist. Insgesamt könnten durch diesen neuen Ansatz, der Zufuhr zellpermeabler CoR-Peptide, wesentliche Ursachen der PCa-Progression unterdrückt werden sowie bereits bestehende Resistenzen überwunden werden. Die inhibierte AR-Transaktivierung in den Reporterassays spiegelt sich in der Reduktion des PSA-Proteins in den PAB-CoR behandelten LNCaP-Zellen wider.

Letztendlich wurde die Hypothese der spezifischen AR-Inaktivierung bestätigt, insbesondere durch TAT-513, welches zum Teil die AR-Proteinmenge reduziert. Dies ist eine zielsicherere Strategie, da auch die nicht-genomischen AR-Signalwege gehemmt werden und darüber hinaus Apoptose in LNCaP-Zellen induziert wird. Ausgehend von der AR-Targetierung führt vor allem TAT-513 zur spezifischen Regulation der zentralen Zellzyklusproteine Cyclin D1, p21, p27 und pRB in LNCaP-Zellen (Abb. 6.1), wodurch die Proliferation infolge eines G1-Arrests effizient gehemmt wird. TAT-524 führt zu schwächeren sowie unspezifischeren

Effekten und steigert als wesentlichen Unterschied die pRB-Phosphorylierung.

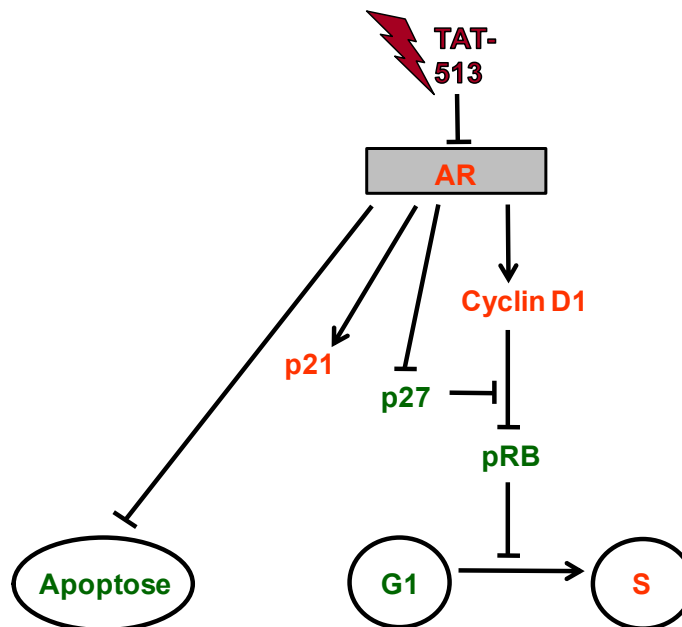


Abb. 6.1) Hypothetische Inhibierung der LNCaP-Zellproliferation durch TAT-513 im niederen nanomolaren Bereich aufgrund der Reduktion der AR-Menge und der daraus folgenden Regulation der Zellzyklusproteine

Die Ursache des TAT-513 -induzierten G1-Arrests sowie der Apoptose ist mutmaßlich die Degradierung des AR-Proteins, darunter auch dessen Isoformen. Die Inhibierung der AR-Transaktivierung führt zum Teil infolge des AR Abbaus zur Repression der AR-Zielgene PSA und p21. Zusammen mit der, jeweils durch den AR Abbau bedingten Cyclin D1 Verminderung unterdrückt vermehrtes p27 die pRB-Phosphorylierung. Das Ergebnis ist ein verlangsamter Übergang zur S-Phase. Des Weiteren vermittelt der AR Abbau vermutlich durch Reduktion von Bcl-xL die Apoptose-Induktion. Darüber hinaus wird Src durch beide Peptide, ohne Einfluss der PA dephosphoryliert (Y416) und demnach inaktiviert, was zur leichten unspezifischen Wachstumshemmung beitragen könnte (nicht gezeigt). Die dargestellten Regulationen erfolgen spezifisch in Abhängigkeit des PA 513 und sind somit wahrscheinlich das Ergebnis der AR Inhibierung. Die TAT-513 Effekte sind wesentlich spezifischer und teilweise effizienter als TAT-524, welches vorrangig PA-unabhängig wirkt und das Wachstum über einen G1-Arrest, jedoch ohne Induktion von Apoptose hemmt. TAT-513 inhibiert im Gegensatz zu TAT-524 gezielt AR-positive PCa-Zellen. In orange sind negative, in grün positive Effekte durch TAT-513 dargestellt.

Die PCa-Wachstumshemmung durch TAT-513, welche ähnlich stark in den androgenunabhängigen C4-2-Zellen, jedoch ohne Beteiligung von Apoptose ist, erfolgt in Abhängigkeit des ARs. Demnach stellt TAT-513, auch aufgrund des fehlenden potenziell immunogenen Gerüstproteins ein sehr aussichtsreiches AR-spezifisches sowie zellpermeables CoR-Peptid zur Hemmung des PCa-Wachstums dar. Unabhängig von kompensatorisch aktivierten Signalwegen nach der ADT sowie Antagonisten bzw. sogar trotz AR-Mutationen sowie LBD-Deletionen könnte TAT-513 die AR-Aktivität vermutlich effektiv, vollständig und konstant inhibieren. Demzufolge wurde in dieser Arbeit mit TAT-513 ein neuer Ansatz zur vektorfreien Peptidtherapie des PCa verwirklicht. Insbesondere die ADT- und Antagonist-resistenten Tumorstadien könnten durch Ausgleich des CoR-Defizits erneut gehemmt werden.

7) Literaturverzeichnis

- Ahmad S, Ali MM, and Mustafa AS. 2003. Construction of a modified vector for efficient purification of recombinant Mycobacterium tuberculosis proteins expressed in Escherichia coli. *Protein expression and purification*, 29(2), 167-175.
- Asim M, Hafeez BB, Siddiqui IA, Gerlach C, Patz M, Mukhtar H, and Baniahmad A. 2011. Ligand-dependent corepressor acts as a novel androgen receptor corepressor, inhibits prostate cancer growth, and is functionally inactivated by the Src-Protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 286(43), 37108-37117.
- Asim M, Siddiqui IA, Hafeez BB, Baniahmad A, and Mukhtar H. 2008. Src kinase potentiates androgen receptor transactivation function and invasion of androgen-independent prostate cancer C4-2 cells. *Oncogene*, 27(25), 3596-3604.
- Asim M. Dissertation. 2006. Regulation of the human Androgen Receptor by Corepressors and Signal Transduction in Prostate Cancer.
- Ayer DE, Laherty CD, Lawrence QA, Armstrong AP, and Eisenman RN. 1996. Mad proteins contain a dominant transcription repression domain. *Molecular and cellular biology*, 16(10), 5772-5781.
- Balk SP, and Knudsen KE. 2008. AR, the cell cycle, and prostate cancer. *Nuclear receptor signaling*, 6 e001
- Baniahmad A, Dressel U, and Renkawitz R. 1998. Cell-specific inhibition of retinoic acid receptor- α silencing by the AF2/ τ c activation domain can be overcome by the corepressor SMRT, but not by N-CoR. *Molecular Endocrinology*, 12(4), 504-512.
- Baniahmad A, Steiner C, Köhne AC, and Renkawitz R. 1990. Modular structure of a chicken lysozyme silencer: involvement of an unusual thyroid hormone receptor binding site. *Cell*, 61(3), 505-514.
- Baratchi S, Kanwar RK, and Kanwar JR. 2011. Survivin mutant protects differentiated dopaminergic SK-N-SH cells against oxidative stress. *PloS one*, 6(1), e15865.
- Barbieri CE, Baca SC, Lawrence MS, Demichelis F, Blattner M, Theurillat JP, White TA, Stojanov P, Van Allen E, Stransky N, Nickerson E, Chae SS, Boysen G, Auclair D, Onofrio RC, Park K, Kitabiyoshi N, MacDonald TY, Sheikh K, Vuong T, Guiducci C, Cibulskis K, Sivachenko A, Carter SL, Saksena G, Voet D, Hussain WM, Ramos AH, Winckler W, Redman MC, Ardlie K, Tewari AK, Mosquera JM, Rupp N, Wild PJ, Moch H, Morrissey C, Nelson PS, Kantoff PW, Gabriel SB, Golub TR, Meyerson M, Lander ES, Getz G, Rubin MA, and Garraway LA. 2012. Exome sequencing identifies recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 mutations in prostate cancer. *Nat Gen* 44(6), 685-689.

- Basak S, Pookot D, Noonan EJ, and Dahiya R. 2008. Genistein down-regulates androgen receptor by modulating HDAC6-Hsp90 chaperone function. *Molecular cancer therapeutics*, 7(10), 3195-3202.
- Bohne J, and Cathomen T. 2008. Genotoxicity in gene therapy: an account of vector integration and designer nucleases. *Current opinion in molecular therapeutics*, 10(3), 214-223.
- Bonaccorsi L, Muratori M, Carloni V, Zecchi S, Formigli L, Forti G, and Baldi E. 2003. Androgen receptor and prostate cancer invasion1. *International journal of andrology*, 26(1), 21-25.
- Bowne WB, Michl J, Bluth MH, Zenilman ME, and Pincus MR. 2007. Novel peptides from the RAS-p21 and p53 proteins for the treatment of cancer. *Cancer therapy*, 5, 331-344.
- Brien G, Debaud AL, Bickle M, Trescol-Biemont MC, Moncorge O, Colas P, and Bonnefoy-Berard N. 2011. Characterization of peptide aptamers targeting Bfl-1 anti-apoptotic protein. *Biochemistry*, 50(23), 5120-5129.
- Buerger C, and Groner B. 2003. Bifunctional recombinant proteins in cancer therapy: cell penetrating peptide aptamers as inhibitors of growth factor signaling. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 129(12), 669-675.
- Buerger C, Nagel-Wolfrum K, Kunz C, Wittig I, Butz K, Hoppe-Seyler F, and Groner B. 2003. Sequence-specific peptide aptamers, interacting with the intracellular domain of the epidermal growth factor receptor, interfere with Stat3 activation and inhibit the growth of tumor cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278(39), 37610-37621.
- Butz K, Denk C, Ullmann A, Scheffner M, and Hoppe-Seyler F. 2000. Induction of apoptosis in human papillomaviruspositive cancer cells by peptide aptamers targeting the viral E6 oncoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(12), 6693-6697.
- Cai C, He HH, Chen S, Coleman I, Wang H, Fang Z, Chen S, Nelson PS, Liu XS, Brown M, and Balk SP. 2011. Androgen receptor gene expression in prostate cancer is directly suppressed by the androgen receptor through recruitment of lysine-specific demethylase 1. *Cancer cell*, 20(4), 457-471.
- Calderon MR, Verway M, An BS, DiFeo A, Bismar TA, Ann DK, Martignetti JA, Shalom-Barak T, and White, JH. 2012. Ligand-dependent Corepressor (LCoR) Recruitment by Krüppel-like Factor 6 (KLF6) Regulates Expression of the Cyclin-dependent Kinase Inhibitor CDKN1A Gene. *Journal of Biological Chemistry*, 287(12), 8662-8674.
- Chan SC, Li Y, and Dehm SM. 2012. Androgen receptor splice variants activate androgen receptor target genes and support aberrant prostate cancer cell growth independent of canonical androgen receptor nuclear localization signal. *Journal of Biological Chemistry*, 287(23), 19736-19749.

- Chang YM, Kung HJ, and Evans CP. 2007. Nonreceptor tyrosine kinases in prostate cancer. *Neoplasia (New York, NY)*, 9(2), 90-100.
- Chen CD, Welsbie DS, Tran C, Baek SH, Chen R, Vessella R, Rosenfeld MG, and Sawyers CL. 2004. Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy. *Nature medicine*, 10(1), 33-39.
- Cheng S, Brzostek S, Lee SR, Hollenberg AN, and Balk SP. 2002. Inhibition of the dihydrotestosterone-activated androgen receptor by nuclear receptor corepressor. *Molecular Endocrinology*, 16(7), 1492-1501.
- Cheung CHA, Sun X, Kanwar J, Bai JZ, Cheng L, and Krissansen G. 2010. A cell-permeable dominant-negative survivin protein induces apoptosis and sensitizes prostate cancer cells to TNF- α therapy. *Cancer cell international*, 10(1), 36.
- Chmelar R, Buchanan G, Need EF, Tilley W, and Greenberg NM. 2007. Androgen receptor coregulators and their involvement in the development and progression of prostate cancer. *International Journal of cancer*, 120(4), 719-733.
- Coffey K, and Robson CN. 2012. Regulation of the androgen receptor by post-translational modifications. *Journal of Endocrinology*, 215(2), 221-237.
- Colas P, Cohen B, Jessen T, Grishina I, McCoy J, and Brent R. 1996. Genetic selection of peptide aptamers that recognize and inhibit cyclin-dependent kinase 2. *Nature*, 380(6574), 548-450.
- Collins L, Zhu T, Guo J, Xiao Z J, and Chen CY. 2006. Phellinus linteus sensitises apoptosis induced by doxorubicin in prostate cancer. *British journal of cancer*, 95(3), 282-288.
- Crawford M, Woodman R, and Ferrigno PK. 2003. Peptide aptamers: tools for biology and drug discovery. *Briefings in functional genomics & proteomics*, 2(1), 72-79.
- Crissman HA, Orlicky DJ, and Kissane RJ. 1979. Fluorescent DNA probes for flow cytometry, Considerations and prospects. *J Histochem Cytochem*, 27, 1652-1654.
- Curtin D, Jenkins S, Farmer N, Anderson AC, Haisenleder DJ, Rissman E, Wilson EM, and Shupnik MA. 2001. Androgen suppression of GnRH-stimulated rat LH β gene transcription occurs through Sp1 sites in the distal GnRH-responsive promoter region. *Molecular Endocrinology*, 15(11), 1906-1917.
- Dai B, Chen H, Guo S, Yang X, Linn DE, Sun F, Li W, Guo Z, Xu K, Kim O, Kong X, Melamed J, Qiu S, Chen H, and Qiu Y. 2010. Compensatory upregulation of tyrosine kinase Etk/BMX in response to androgen deprivation promotes castration-resistant growth of prostate cancer cells. *Cancer research*, 70(13), 5587-5596.

- Deeble PD, Cox ME, Frierson HF, Sikes RA, Palmer JB, Davidson RJ, Casarez EV, Amorino GP, and Parsons SJ. 2007. Androgen-independent growth and tumorigenesis of prostate cancer cells are enhanced by the presence of PKA-differentiated neuroendocrine cells. *Cancer research*, 67(8), 3663-3672.
- Dehm SM, and Tindall DJ. 2011. Alternatively spliced androgen receptor variants. *Endocrine-related cancer*, 18(5), R183-R196.
- Dehm SM, Regan KM, Schmidt LJ, and Tindall DJ. 2007. Selective Role of an NH₂-Terminal WxxLF Motif for Aberrant Androgen Receptor Activation in Androgen Depletion-Independent Prostate Cancer Cells. *Cancer research*, 67(20), 10067-10077.
- Dehm SM, and Tindall DJ. 2006. Molecular regulation of androgen action in prostate cancer. *Journal of cellular biochemistry*, 99(2), 333-344.
- Denmeade SR, and Isaacs, JT. 2002. A history of prostate cancer treatment. *Nature Reviews Cancer*, 2(5), 389-396.
- Dike IP, and Obembe OO. 2013. Effect of sucrose and propylene glycol on the vitrification of sheep oocytes. *Journal of Cell and Animal Biology*, 7(3), 25-30.
- Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, Peacocke M, and Campisi J. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *PNAS*, 92, 9363-9367.
- Dotzlaw H, Moehren U, Mink S, Cato AC, Lluhí JAI, and Baniahmad A. 2002. The amino terminus of the human AR is target for corepressor action and antihormone agonism. *Molecular Endocrinology*, 16(4), 661-673.
- Dubbink HJ, Hersmus R, Pike AC, Molier M, Brinkmann AO, Jenster G, and Trapman J. 2006. Androgen receptor ligand-binding domain interaction and nuclear receptor specificity of FXXLF and LXXLL motifs as determined by L/F swapping. *Molecular endocrinology*, 20(8), 1742-1755.
- Duff J, Davies P, Watt K, and McEwan IJ. 2006. Structural dynamics of the human androgen receptor: implications for prostate cancer and neurodegenerative disease. *Biochemical Society Transactions*, 34(6), 1098-1102.
- Dutertre M, and Smith CL. 2003. Ligand-independent interactions of p160/steroid receptor coactivators and CREB-binding protein (CBP) with estrogen receptor- α : regulation by phosphorylation sites in the A/B region depends on other receptor domains. *Molecular Endocrinology*, 17(7), 1296-1314.
- Eckey M. Dissertation. 2001. Identifizierung neuer Interaktionspartner des Corepressors Alien.

- Edwards J, and Bartlett J. 2005. The androgen receptor and signal-transduction pathways in hormone-refractory prostate cancer, Part 1: Modifications to the androgen receptor. *Mol Cell* 11(1), 139-150.
- Eisold M, Asim M, Eskelinen H, Linke T, and Baniahmad A. 2009. Inhibition of MAPK-signaling pathway promotes the interaction of the corepressor SMRT with the human androgen receptor and mediates repression of prostate cancer cell growth in the presence of antiandrogens. *Journal of molecular endocrinology*, 42(5), 429-435.
- Eschenbach AC, and Chung LW. 1994. Androgen-independent cancer progression and bone metastasis in the LNCaP model of human prostate cancer. *Cancer Res* 54, 2577-2581.
- Feldman BJ, and Feldman D. 2001. The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer*, 1, 34-45.
- Fernandes I, Bastien Y, Wai T, Nygard K, Lin R, Cormier O, Lee HS, Eng F, Bertos NR, Pelletier N, Mader S, Han VK, Yang XJ, and White JH. 2003. Ligand-dependent nuclear receptor corepressor LCoR functions by histone deacetylase-dependent and-independent mechanisms. *Molecular cell*, 11(1), 139-150.
- Fortmüller K, Alt K, Gierschner D, Wolf P, Baum V, Freudenberg N, Wetterauer U, Elsässer-Beile U, and Bühler P. 2011. Effective targeting of prostate cancer by lymphocytes redirected by a PSMA \times CD3 bispecific single-chain diabody. *The Prostate*, 71(6), 588-596.
- Fuhrmann U, Parczyk K, Klotzbucher M, Klocker H, and Cato AC. 1998. Recent developments in molecular action of antihormones. *J Mol Med*, 76, 512-524.
- Furutani T, Watanabe T, Tanimoto K, Hashimoto T, Koutoku H, Kudoh M, Shimizu Y, Kato S, and Shikama, H. 2002. Stabilization of androgen receptor protein is induced by agonist, not by antagonists. *Biochemical and biophysical research communications*, 294(4), 779-784.
- Futaki S, Nakase I, Tadokoro A, Takeuchi T, and Jones AT. 2007. Arginine-rich peptides and their internalization mechanism. *Biochemical Society Transactions*, 35, 784-787.
- Gamble SC, Chotai D, Odontiadis M, Dart DA, Brooke GN, Powell SM, Reebye V, Varela-Carver A, Kawano Y, Waxman J, and Bevan CL. 2007. Prohibitin, a protein downregulated by androgens, represses androgen receptor activity. *Oncogene*, 26(12), 1757-1768.
- Garraway LA, and Sellers WR. 2006. Lineage dependency and lineage-survival oncogenes in human cancer. *Nature Reviews Cancer*, 6(8), 593-602.
- Gast A, Schneikert J, Cato AC. 1998. N-terminal sequences of the human androgen receptor in DNA binding and transrepressing functions. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 65(1-6), 117 – 123.

- Gerlach C*, Roell D*, and Baniahmad A. 2011. Analysis of Ligand-Specific Co-repressor Binding to the Androgen Receptor. *Androgen Action*, pp. 199-223. Humana Press. **equally contributed*
- Gerlach C. Diplomarbeit. 2008. Generierung eines Zell-permeablen Androgenrezeptor-spezifischen Corepressors und dessen Charakterisierung in Prostatakrebszellen.
- Ghanem A. Master Thesis. 2012. Optimization of the bacterial expression of Alien and the peptide aptamer as corepressors for the androgen receptor.
- Gibert B, Simon S, Dimitrova V, Diaz-Latoud C, and Arrigo AP. 2013. Peptide aptamers: tools to negatively or positively modulate HSPB1 (27) function. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(1617), 20120075. doi: 10.1098/rstb.2012.0075.
- Gibert B, Hadchity E, Czekalla A, Aloy MT, Colas P, Rodriguez-Lafrasse C, Arrigo AP, and Diaz-Latoud C. 2011. Inhibition of heat shock protein 27 (HspB1) tumorigenic functions by peptide aptamers. *Oncogene*, 30(34), 3672-3681.
- Godoy AS, Sotomayor PC, Villagran M, Yacoub R, Montecinos VP, McNerney EM, Moser M, Foster BA, and Onate SA. 2012. Altered corepressor SMRT expression and recruitment to target genes as a mechanism that change the response to androgens in prostate cancer progression. *Biochemical and biophysical research communications*, 423(3), 564-570.
- Goeman F, Thormeyer D, Abad M, Serrano M, Schmidt O, Palmero I, and Baniahmad, A. 2005. Growth inhibition by the tumor suppressor p33ING1 in immortalized and primary cells: involvement of two silencing domains and effect of Ras. *Molecular and cellular biology*, 25(1), 422-431.
- Green M, and Loewenstein PM. 1988. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus Tat Trans-activator protein. *Cell*, 55(6), 1179-1188.
- Gregory CW, He B, Johnson RT, Ford OH, Mohler JL, French FS, and Wilson EM. 2001. A mechanism for androgen receptor-mediated prostate cancer recurrence after androgen deprivation therapy. *Cancer research*, 61(11), 4315-4319.
- Grosse A, Bartsch S, and Baniahmad A. 2012. Androgen receptor-mediated gene repression. *Molecular and cellular endocrinology*, 352(1), 46-56.
- Guida E, Bisso A, Fenollar-Ferrer C, Napoli M, Anselmi C, Girardini JE, Carloni P, and Del Sal G. 2008. Peptide aptamers targeting mutant p53 induce apoptosis in tumor cells. *Cancer research*, 68(16), 6550-6558.

- Guo Z, Yang X, Sun F, Jiang R, Linn DE, Chen H, Kong X, Melamed J, Tepper CG, Kung HJ, Brodie AM, Edwards J, and Qiu, Y. 2009. A novel androgen receptor splice variant is up-regulated during prostate cancer progression and promotes androgen depletion-resistant growth. *Cancer research*, 69(6), 2305-2313.
- Guo Z, Dai B, Jiang T, Xu K, Xie Y, Kim O, Nesheiwat I, Kong X, Melamed J, Handratta VD, Njar VC, Brodie AM, Yu LR, Veenstra TD, Chen H, and Qiu Y. 2006. Regulation of androgen receptor activity by tyrosine phosphorylation. *Cancer cell*, 10(4), 309-319.
- Guruprasad K, Reddy BV, Pandit MW. 1990. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. *Protein Eng* 4 (2), 155–161.
- Haile S, and Sadar MD. 2011. Androgen receptor and its splice variants in prostate cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(24), 3971-3981.
- Hamilton S, Odili J, Pacifico Marc D, Wilson GD, and Kupsch JM. 2003. Effect of imidazole on the solubility of a his-tagged antibody fragment. *Hybrid Hybridomics* 22 (6), 347–355.
- Hara T, Miyazaki H, Lee A, Tran CP, and Reiter RE. 2008. Androgen receptor and invasion in prostate cancer. *Cancer research*, 68(4), 1128-1135.
- Hara T, Miyazaki J, Araki H, Yamaoka M, Kanzaki N, Kusaka M, and Miyamoto M. 2003. Novel mutations of androgen receptor: a possible mechanism of bicalutamide withdrawal syndrome. *Cancer Res* 63, 149-153.
- Harada H, Kizaka-Kondoh S, and Hiraoka M. 2006. Antitumor protein therapy; application of the protein transduction domain to the development of a protein drug for cancer treatment. *Breast Cancer*, 13(1), 16-26.
- Hay RT. 2005. SUMO: a history of modification. *Molecular cell*, 18, 1-12.
- Heery DM, Kalkhoven E, Hoare S, and Parker MG. 1997. A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature*, 387(6634), 733-736.
- Heinlein CA, and Chang C. 2002. The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. *Molecular Endocrinology*, 16(10), 2181-2187.
- Heinßmann M. Diplomarbeit. 2010. Herstellung rekombinanter spezifischer Corepressor-Proteine für den Androgenrezeptor und deren funktionelle Analysen.
- Heitz F, Morris MC, and Divita G. 2009. Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *British journal of pharmacology*, 157(2), 195-206.
- Hessenkemper W, and Baniahmad A. 2013. Targeting Heat Shock Proteins in Prostate Cancer. *Current medicinal chemistry*, 20(22), 2731-2740.

- Hessenkemper W. Dissertation. 2013. Analysis of the molecular mechanisms of androgen receptor inhibition by novel antagonists.
- Hodgson MC, Astapova I, Cheng S, Lee LJ, Verhoeven MC, Choi E, Balk SP, and Hollenberg AN. 2005. The androgen receptor recruits nuclear receptor CoRepressor (N-CoR) in the presence of mifepristone via its N and C termini revealing a novel molecular mechanism for androgen receptor antagonists. *Journal of Biological Chemistry*, 280(8), 6511-6519.
- Hoppe-Seyler F, and Butz K. 2000. Peptide aptamers: powerful new tools for molecular medicine. *Journal of molecular medicine*, 78(8), 426-430.
- Hörnberg E, Ylitalo EB, Crnalic S, Antti H, Stattin P, Widmark A, Bergh A, and Wikström, P. 2011. Expression of androgen receptor splice variants in prostate cancer bone metastases is associated with castration-resistance and short survival. *PLoS One*, 6(4), e19059.
- Hsieh TC, and Wu JM. 2000. Grape-derived chemopreventive agent resveratrol decreases prostate-specific antigen (PSA) expression in LNCaP cells by an androgen receptor (AR)-independent mechanism. *Anticancer research*, 20(1A), 225-228.
- Hu R, Lu C, Mostaghel EA, Yegnasubramanian S, Gurel M, Tannahill C, Edwards J, Isaacs WB, Nelson PS, Bluemn E, Plymate SR, and Luo J. 2012. Distinct transcriptional programs mediated by the ligand-dependent full-length androgen receptor and its splice variants in castration-resistant prostate cancer. *Cancer research*, 72(14), 3457-3462.
- Hu R, Dunn TA, Wei S, Isharwal S, Veltri RW, Humphreys E, Han M, Partin AW, Vessella RL, Isaacs WB, Bova GS, and Luo J. 2009. Ligand-independent androgen receptor variants derived from splicing of cryptic exons signify hormone-refractory prostate cancer. *Cancer research*, 69(1), 16-22.
- Inagaki K, Chen L, Ikeno F, Lee FH, Imahashi KI, Bouley DM, Rezaee M, Yock PG, Murphy E, and Mochly-Rosen D. 2003. Inhibition of δ -protein kinase C protects against reperfusion injury of the ischemic heart in vivo. *Circulation*, 108(19), 2304-2307.
- Jensen FC, Girardi AJ, Gilden RV, and Koprowski H. 1964. Infection of human and simian tissue cultures with Rous Sarcoma. *PNAS*, 52, 53-59.
- Jenster G, van der Korput HA, Trapman J, and Brinkmann AO. 1995. Identification of two transcription activation units in the N-terminal domain of the human androgen receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 270(13), 7341-7346.
- Jenster G, van der Korput HA, van Vroonhoven C, van der Kwast TH, Trapman J, and Brinkmann AO. 1991. Domains of the human androgen receptor involved in steroid binding, transcriptional activation, and subcellular localization. *Molecular Endocrinology*, 5(10), 1396-1404.

- Jones SW, Christison R, Bundell K, Voyce CJ, Brockbank S, Newham P, and Lindsay MA. 2005. Characterisation of cell-penetrating peptide-mediated peptide delivery. *British journal of pharmacology*, 145(8), 1093-1102.
- Kaarbo M, Klok T, and Saatcioglu F. 2007. Androgen signaling and its interactions with other signaling pathways in prostate cancer. *Bioessays* 29, 1227-1238.
- Kaelin, WG, Jr Pallas DC, DeCaprio JA, Kaye FJ, and Livingston DM. 1991. Identification of cellular Proteins that can interact specifically with the T/E1A-binding region of the retinoblastoma gene product. *Cell* 64, 521-532.
- Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, and Jones LW. 1979. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Investigative urology*, 17(1), 16-23.
- Kamitani T, Nguyen HP, and Yeh ET. 1997. Preferential modification of nuclear proteins by a novel ubiquitin-like molecule. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 14001-14004.
- Kanwar JR, Gibbons J, Verma AK, and Kanwar RK. 2012. Cell-penetrating properties of the transactivator of transcription and polyarginine (R9) peptides, their conjugative effect on nanoparticles and the prospect of conjugation with arsenic trioxide. *Anti-cancer drugs*, 23(5), 471-482.
- Karantanos T, Corn PG, and Thompson TC. 2013. Prostate cancer progression after androgen deprivation therapy: mechanisms of castrate resistance and novel therapeutic approaches. *Oncogene*, 32(49), 5501-5511.
- Kerr JF, Wyllie AH, and Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 26(4), 239-257.
- Knudsen KE, and Kelly WK. 2011. Outsmarting androgen receptor: creative approaches for targeting aberrant androgen signaling in advanced prostate cancer. *Expert review of endocrinology & metabolism*, 6(3), 483-493.
- Kregel S, Kiriluk KJ, Rosen AM, Cai Y, Reyes EE, Otto KB, Tom W, Paner GP, Szmulewitz RZ, and Vander Griend DJ. 2013. Sox2 is an androgen receptor-repressed gene that promotes castration-resistant prostate cancer. *PloS one*, 8(1), e53701.
- Kunz C, Borghouts C, Buerger C, and Groner B. 2006. Peptide aptamers with binding specificity for the intracellular domain of the ErbB2 receptor interfere with AKT signaling and sensitize breast cancer cells to Taxol. *Molecular cancer research*, 4(12), 983-998.
- Kvissel AK, Ramberg H, Eide T, Svindland A, Skålhegg BS, and Taskén KA. 2007. Androgen dependent regulation of protein kinase A subunits in prostate cancer cells. *Cellular signalling*, 19(2), 401-409.

- Labrie F, Dupont A, Giguere M, Borsanyi JP, Lacourciere Y, Monfette G, Emond J, and Bergeron N. 1988. Benefits of combination therapy with flutamide in patients relapsing after castration. *Br J Urol*, 61, 341-346.
- Ladner RC, Sato AK, Gorzelany J, and de Souza, M. 2004. Phage display-derived peptides as therapeutic alternatives to antibodies. *Drug discovery today*, 9(12), 525-529.
- Ladner RC. 1995. Constrained peptides as binding entities. *Trends in biotechnology*, 13(10), 426-430.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Laxman B, Morris DS, Yu J, Siddiqui J, Cao J, Mehra R, Lonigro RJ, Tsodikov A, Wei JT, Tomlins SA, and Chinnaiyan AM. 2008. A first-generation multiplex biomarker analysis of urine for the early detection of prostate cancer. *Cancer research*, 68(3), 645-649.
- Lee BY, Han JA, Im JS, Morrone A, Johung K, Goodwin EC, Kleijer WJ, DiMaio D, Hwang ES. 2006. Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell*, 5(2), 187–195.
- Li Y, Chan SC, Brand LJ, Hwang TH, Silverstein KA, and Dehm SM. 2013. Androgen receptor splice variants mediate enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer cell lines. *Cancer research*, 73(2), 483-489.
- Li Y, Hwang T, Oseth L, Hauge A, Vessella RL, Schmechel SC, Hirsch B, Beckman KB, Silverstein KA, and Dehm SM. 2012. AR intragenic deletions linked to androgen receptor splice variant expression and activity in models of prostate cancer progression. *Oncogene*, 31(45), 4759-4767.
- Li Y, Alsagabi M, Fan D, Bova GS, Tewfik AH, and Dehm SM. 2011. Intragenic rearrangement and altered RNA splicing of the androgen receptor in a cell-based model of prostate cancer progression. *Cancer research*, 71(6), 2108-2117.
- Liao X, Tang S, Thrasher JB, Griebeling TL, and Li B. 2005. Small-interfering RNA–induced androgen receptor silencing leads to apoptotic cell death in prostate cancer. *Molecular cancer therapeutics*, 4(4), 505-515.
- Lincová E, Hampl A, Pernicová Z, Staršíchová A, Krčmář P, Machala M, Kozubík A, and Souček K. 2009. Multiple defects in negative regulation of the PKB/Akt pathway sensitise human cancer cells to the antiproliferative effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Biochemical pharmacology*, 78(6), 561-572.
- Liu K, Lin B, and Lan X. 2013a. Aptamers: A promising tool for cancer imaging, diagnosis, and therapy. *Journal of Cellular Biochemistry*, 114(2), 250-255.

- Liu C, Zhu Y, Lou W, Nadiminty N, Chen X, Zhou Q, Shi XB, deVere White RW, and Gao AC. 2013b. Functional p53 determines docetaxel sensitivity in prostate cancer cells. *The Prostate*, 73(4), 418-427.
- Loneragan PE, and Tindall DJ. 2011. Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression. *Journal of carcinogenesis*, 10(1), 20.
- Lorenz V, Hessenkemper W, Rödiger J, Kyrylenko S, Kraft F, and Baniahmad A. 2011. Sodium butyrate induces cellular senescence in neuroblastoma and prostate cancer cells. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 7(1), 265-272.
- Lu S, Liu M, Epner DE, Tsai SY, and Tsai MJ. 1999. Androgen regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 gene through an androgen response element in the proximal promoter. *Molecular Endocrinology*, 13(3), 376-384.
- Mascini M, Palchetti I, and Tombelli S. 2012. Nucleic acid and peptide aptamers: fundamentals and bioanalytical aspects. *Angewandte Chemie International Edition*, 51(6), 1316-1332.
- Massie CE, Lynch A, Ramos-Montoya A, Boren J, Stark R, Fazli L, Warren A, Scott H, Madhu B, Sharma N, Bon H, Zecchini V, Smith DM, Denicola GM, Mathews N, Osborne M, Hadfield J, Macarthur S, Adryan B, Lyons SK, Brindle KM, Griffiths J, Gleave ME, Rennie PS, Neal DE, Mills IG. 2011. The androgen receptor fuels prostate cancer by regulating central metabolism and biosynthesis. *EMBO Journal*, 30, 2719–2733.
- McCall P, Gemmell LK, Mukherjee R, Bartlett JMS, and Edwards J. 2008. Phosphorylation of the androgen receptor is associated with reduced survival in hormonerefractory prostate cancer patients. *British Journal of Cancer*, 98, 1094-1101.
- McEwan IJ. 2004. Molecular mechanisms of androgen receptor-mediated gene regulation: structure-function analysis of the AF-1 domain. *Endocrine-related cancer*, 11(2), 281-293.
- Mellinghoff IK, Vivanco I, Kwon A, Tran C, Wongvipat J, and Sawyers CL. 2004. HER2/neu kinase-dependent modulation of androgen receptor function through effects on DNA binding and stability. *Cancer cell*, 6(5), 517-527.
- Melnick A. 2007. Targeting aggressive B-cell lymphomas with cell-penetrating peptides. *Biochemical Society transactions*, 35(4), 802-806.
- Mern DS, Hoppe-Seyler K, Hoppe-Seyler F, Hasskarl J, and Burwinkel B. 2010. Targeting Id1 and Id3 by a specific peptide aptamer induces E-box promoter activity, cell cycle arrest, and apoptosis in breast cancer cells. *Breast cancer research and treatment*, 124(3), 623-633.

- Migliaccio A, Varricchio L, De Falco A, Castoria G, Arra C, Yamaguchi H, Ciociola A, Lombardi M, Di Stasio R, Barbieri A, Baldi A, Barone MV, Appella E, and Auricchio F. 2007. Inhibition of the SH3 domain-mediated binding of Src to the androgen receptor and its effect on tumor growth. *Oncogene*, 26(46), 6619-6629.
- Migliaccio A, Castoria G, Di Domenico M, de Falco A, Lombardi M, Barone MV, Ametrano D, Zannini MS, Abbondanza C, Auricchio F. 2000. Steroid-induced androgen receptor-estradiol receptor beta-Src complex triggers prostate cancer cell proliferation. *EMBO Journal*, 19(20), 5406-5417.
- Mirochnik Y, Veliceasa D, Williams L, Maxwell K, Yemelyanov A, Budunova I, and Volpert OV. 2012. Androgen receptor drives cellular senescence. *PloS one*, 7(3), e31052.
- Moehren U, Papaioannou M, Reeb CA, Grasselli A, Nanni S, Asim M, Roell D, Prade I, Farsetti A, and Baniahmad A. 2008. Wild-type but not mutant androgen receptor inhibits expression of the hTERT telomerase subunit: a novel role of AR-Mutation for prostate cancer development. *The FASEB Journal*, 22(4), 1258-1267.
- Moehren U, Papaioannou M, Reeb CA, Hong W, and Baniahmad A. 2007. Alien interacts with the human androgen receptor and inhibits prostate cancer cell growth. *Molecular Endocrinology*, 21(5), 1039-1048.
- Mostaghel EA, Marck BT, Plymate SR, Vessella RL, Balk S, Matsumoto AM, and Montgomery RB. 2011. Resistance to CYP17A1 inhibition with abiraterone in castration-resistant prostate cancer: induction of steroidogenesis and androgen receptor splice variants. *Clinical cancer research*, 17(18), 5913-5925.
- Nadiminty N, Chun JY, Lou W, Lin X, and Gao AC. 2008. NF- κ B2/p52 enhances androgen-independent growth of human LNCaP cells via protection from apoptotic cell death and cell cycle arrest induced by androgen-deprivation. *The Prostate*, 68(16), 1725-1733.
- Nagel F, Dohm CP, Bähr M, Wouters FS, and Dietz GP. 2008. Quantitative evaluation of chaperone activity and neuroprotection by different preparations of a cell-penetrating Hsp70. *Journal of neuroscience methods*, 171(2), 226-232.
- Nagel-Wolfrum K, Buerger C, Wittig I, Butz K, Hoppe-Seyler F, and Groner B. 2004. The Interaction of Specific Peptide Aptamers With the DNA Binding Domain and the Dimerization Domain of the Transcription Factor Stat3 Inhibits Transactivation and Induces Apoptosis in Tumor Cells. *Molecular cancer research*, 2(3), 170-182.
- Nigatu AS, Vupputuri S, Flynn N, Neely BJ, and Ramsey JD. 2013. Evaluation of cell-penetrating peptide/adenovirus particles for transduction of CAR-negative cells. *Journal of pharmaceutical sciences*, 102(6), 1981-1993.
- Nordheim A. 1994. Transcription factors. CREB takes CBP to tango. *Nature*, 370(6486), 177-178.

- Nyquist MD, and Dehm SM. 2013. Interplay Between Genomic Alterations and Androgen Receptor Signaling During Prostate Cancer Development and Progression. *Hormones and Cancer*, 4(2), 61-69.
- Oktay M, Wary KK, Dans M, Birge RB, and Giancotti FG. 1999. Integrin-mediated activation of focal adhesion kinase is required for signaling to Jun NH2-terminal kinase and progression through the G1 phase of the cell cycle. *The Journal of cell biology*, 145(7), 1461-1470.
- Ormerod MG, Payne AW, and Watson JV. 1987. Improved program for the analysis of DNA histograms. *Cytometry*, 8, 637-641.
- Palijan A, Fernandes I, Verway M, Kourelis M, Bastien Y, Tavera-Mendoza LE, Sacheli A, Bourdeau V, Mader S, and White JH. 2009a. Ligand-dependent corepressor LCoR is an attenuator of progesterone-regulated gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, 284(44), 30275-30287.
- Palijan A, Fernandes I, Bastien Y, Tang L, Verway M, Kourelis M, Tavera-Mendoza LE, Li Z, Bourdeau V, Mader S, Yang XJ, and White JH. 2009b. Function of histone deacetylase 6 as a cofactor of nuclear receptor coregulator LCoR. *Journal of Biological Chemistry*, 284(44), 30264-30274.
- Patel LN, Zaro JL, and Shen WC. 2007. Cell penetrating peptides: intracellular pathways and pharmaceutical perspectives. *Pharmaceutical research*, 24(11), 1977-1992.
- Pedram A, Razandi M, Sainson RCA, Kim JK, Hughes CC, and Levin ER. 2007. A conserved mechanism of steroid receptor translocation to the plasma membrane. *J Biol Chem*, 282, 22278-22288.
- Pereira-Smith O, Peacocke M, and Campisi J. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *PNAS*, 92, 9363-9367.
- Peterziel H, Mink S, Schonert A, Becker M, Klocker H, and Cato AC. 1999. Rapid signalling by androgen receptor in prostate cancer cells. *Oncogene* 18, 6322-6329.
- Poukka H, Karvonen U, Jänne OA, and Palvimo JJ. 2000. Covalent modification of the androgen receptor by small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(26), 14145-14150.
- Prade I. Diplomarbeit. 2008. Ein Androgenrezeptor-spezifisches Peptidaptamer hemmt die Transaktivierung des Rezeptors, das Prostatakrebszellwachstum und die Invasivität.
- Protopopov AI, Li J, Winberg G, Gizatullin RZ, Kashuba VI, Klein G, and Zabarovsky ER. 2002. Human cell lines engineered for tetracycline-regulated expression of tumor suppressor candidate genes from a frequently affected chromosomal region, 3p21. *J Gene Med*, 4, 397-406.

- Reeb CA*, Gerlach C*, Heinssmann M, Prade I, Ceraline J, Roediger J, Roell D, and Baniahmad A. 2011. A designed cell-permeable aptamer-based corepressor peptide is highly specific for the androgen receptor and inhibits prostate cancer cell growth in a vector-free mode. *Endocrinology*, 152(6), 2174-2183. **equally contributed*
- Renart J, Reiser J, and Stark GR. 1979. Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *PNAS*, 76, 3116-3120.
- Rérole AL, Gobbo J, De Thonel A, Schmitt E, de Barros JPP, Hammann A, Lanneau D, Fourmaux E, Deminov O, Micheau O, Lagrost L, Colas P, Kroemer G, and Garrido C. 2011. Peptides and aptamers targeting HSP70: a novel approach for anticancer chemotherapy. *Cancer research*, 71(2), 484-495.
- Rödiger J. Dissertation. 2012. Analyse der Androgenrezeptor Agonist- und Antagonist-vermittelten zellulären Seneszenz in Prostatakrebszellen.
- Roell D, and Baniahmad A. 2011. The natural compounds atraric acid and N-butylbenzene-sulfonamide as antagonists of the human androgen receptor and inhibitors of prostate cancer cell growth. *Molecular and cellular endocrinology*, 332(1), 1-8.
- Roisin A, Robin JP, Dereuddre-Bosquet N, Vitte AL, Dormont D, Clayette P, and Jalinot P. 2004. Inhibition of HIV-1 replication by cell-penetrating peptides binding Rev. *Journal of Biological Chemistry*, 279(10), 9208-9214.
- Rothbard JB, Jessop TC, Lewis RS, Murray BA, and Wender PA. 2004. Role of membrane potential and hydrogen bonding in the mechanism of translocation of guanidinium-rich peptides into cells. *Journal of the American Chemical Society*, 126(31), 9506-9507.
- Sadar MD. 1999. Androgen-independent induction of prostate-specific antigen gene expression via cross-talk between the androgen receptor and protein kinase A signal transduction pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 274(12), 7777-7783.
- Sakai N, Takeuchi T, Futaki S, and Matile S. 2005. Direct Observation of Anion-Mediated Translocation of Fluorescent Oligoarginine Carriers into and across Bulk Liquid and Anionic Bilayer Membranes. *ChemBioChem*, 6(1), 114-122.
- Sarwar M, Sandberg S, Abrahamsson PA, and Persson JL. 2013. Protein kinase A (PKA) pathway is functionally linked to androgen receptor (AR) in the progression of prostate cancer. In *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 32(1), 25.e1-25.e12.
- Schärlich K. Bachelorarbeit. 2012. Generierung und Expression von Androgenrezeptor-spezifischen Peptidaptameren mit der Proteintransduktionsdomäne TAT.
- Scharnagl C, Reif M, Friedrich J. 2005. Stability of proteins: temperature, pressure and the role of the solvent. *Biochim Biophys Acta* 1749 (2), 187–213.

- Seigneuric R, Gobbo J, Colas P, and Garrido C. 2011. Targeting cancer with peptide aptamers. *Oncotarget*, 2(7), 557-561.
- Shi Y, Sawada JI, Sui G, Affar EB, Whetstine JR, Lan F, Ogawa H, Luke MP, Nakatani Y, and Shi Y. 2003. Coordinated histone modifications mediated by a CtBP co-repressor complex. *Nature*, 422(6933), 735-738.
- Shin MC, Zhang J, Min KA, Lee K, Byun Y, David AE, He H, and Yang VC. 2014. Cell-penetrating peptides: Achievements and challenges in application for cancer treatment. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 102(2), 575-587.
- Siegel R, Naishadham D, and Jemal A. 2012. Cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*, 62(1), 10-29.
- Simental JA, Sar M, Lane MV, French FS, and Wilson EM. 1991. Transcriptional activation and nuclear targeting signals of the human androgen receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 266(1), 510-518.
- Snyder EL, Meade BR, Saenz CC, and Dowdy SF. 2004. Treatment of terminal peritoneal carcinomatosis by a transducible p53-activating peptide. *PLoS biology*, 2(2), e36.
- Southwell J, Chowdhury SF, Gottlieb B, Beitel LK, Lumbroso R, Purisima EO, and Trifiro M. 2008. An investigation into CAG repeat length variation and N/C terminal interactions in the T877A mutant androgen receptor found in prostate cancer. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 111(1), 138-146.
- Srivastava SK, Bhardwaj A, Singh S, Arora S, McClellan S, Grizzle WE, Reed E, and Singh AP. 2012. Myb overexpression overrides androgen depletion-induced cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cells, and confers aggressive malignant traits: potential role in castration resistance. *Carcinogenesis*, 33(6), 1149-1157.
- Srivastava RK, Chen Q, Siddiqui I, Sarva K, and Shankar S. 2007. Linkage of curcumin-induced cell cycle arrest and apoptosis by cyclin-dependent kinase inhibitor p21/WAF1/CIP1. *Cell Cycle*, 6(23), 2953-2961.
- Stein GH, Drullinger LF, Soulard A, Dulic V. 1999. Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol Cell Biol*, 19, 2109-2117.
- Sun S, Sprenger CC, Vessella RL, Haugk K, Soriano K, Mostaghel EA, Page ST, Coleman IM, Nguyen HM, Sun H, Nelson PS, and Plymate SR. 2010. Castration resistance in human prostate cancer is conferred by a frequently occurring androgen receptor splice variant. *The Journal of clinical investigation*, 120(8), 2715.
- Taplin ME. 2007. Drug insight: role of the androgen receptor in the development and progression of prostate cancer. *Nature Clinical Practice Oncology*, 4(4), 236-244.

- Taplin ME, Bubley GJ, Ko YJ, Small EJ, Upton M, Rajeshkumar B, and Balk SP. 1999. Selection for androgen receptor mutations in prostate cancers treated with androgen antagonist. *Cancer research*, 59(11), 2511-2515.
- Tatarov O, Mitchell TJ, Seywright M, Leung HY, Brunton VG, and Edwards J. 2009. SRC family kinase activity is up-regulated in hormone-refractory prostate cancer. *Clinical Cancer Research*, 15(10), 3540-3549.
- Tenbaum SP, Papaioannou M, Reeb CA, Goeman F, Escher N, Kob R, von Eggeling F, Melle C, and Baniahmad A. 2007. Alien inhibits E2F1 gene expression and cell proliferation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1773(9), 1447-1454.
- Thalmann GN, Anezinis PE, Chang SM, Zhau HE, Kim EE, Hopwood VL, Pathak S von Eschenbach AC, and Chung LW. 1994. Androgen-independent cancer progression and bone metastasis in the LNCaP model of human prostate cancer. *Cancer Res* 54, 2577-2581.
- Tran C, Ouk S, Clegg NJ, Chen Y, Watson PA, Arora V, Wongvipat J, Smith-Jones PM, Yoo D, Kwon A, Wasielewska T, Welsbie D, Chen CD, Higano CS, Beer TM, Hung DT, Scher HI, Jung ME, and Sawyers, CL. 2009. Development of a second-generation antiandrogen for treatment of advanced prostate cancer. *Science*, 324(5928), 787-790.
- Treuter E, and Venteclef N. 2011. Transcriptional control of metabolic and inflammatory pathways by nuclear receptor SUMOylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1812(8), 909-918.
- Umesono K, and Evans RM. 1989. Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell*, 57(7), 1139-1146.
- van Royen ME, van Cappellen WA, de Vos C, Houtsmuller AB, and Trapman J. 2012. Stepwise androgen receptor dimerization. *Journal of Cell Science*, 125(8), 1970-1979.
- Varlakhanova N, Hahm JB, and Privalsky ML. 2011. Regulation of SMRT corepressor dimerization and composition by MAP kinase phosphorylation. *Molecular and cellular endocrinology*, 332(1), 180-188.
- Veldscholte J, Berrevoets CA, Ris-Stalpers C, Kuiper GG, Jenster G, Trapman J, Brinkmann AO, and Mulder E. 1992. The androgen receptor in LNCaP cells contains a mutation in the ligand binding domain which affects steroid binding characteristics and response to antiandrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 41, 665-669.
- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, and Reutelingsperger C. 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*, 184, 39-51.

- Verras M, Lee J, Xue H, Li TH, Wang Y, and Sun Z. 2007. The androgen receptor negatively regulates the expression of c-Met: implications for a novel mechanism of prostate cancer progression. *Cancer research*, 67(3), 967-975.
- Visakorpi T, Hyytinen E, Koivisto P, Tanner M, Keinänen R, Palmberg C, Palotie A, Tammela T, Isola J, and Kallioniemi OP. 1995. In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. *Nature genetics*, 9(4), 401-406.
- Wadia JS, and Dowdy SF. 2005. Transmembrane delivery of protein and peptide drugs by TAT-mediated transduction in the treatment of cancer. *Advanced drug delivery reviews*, 57(4), 579-596.
- Waltering KK, Urbanucci A, Visakorpi T. 2012. Androgen receptor (AR) aberrations in castration-resistant prostate cancer. *Mol and Cell Endo*, 360(1), 38-43.
- Wang X, Li X, and Li Y. 2007. A modified Coomassie Brilliant Blue staining at nanogram sensitivity compatible with proteomic analysis. *Biotechnol Letters*, 29, 1599 – 1603.
- Wang L, Hsu CL, and Chang C. 2005. Androgen receptor corepressors: an overview. *The Prostate*, 63(2), 117-130.
- Warwicker J, O'Connor J. 1995. A model for vicilin solubility at mild acidic pH, based on homology modelling and electrostatics calculations. *Protein Eng*, 8 (12), 1243–1251.
- Watson PA, Chen YF, Balbas MD, Wongvipat J, Socci ND, Viale A, Kim K, and Sawyers CL. 2010. Constitutively active androgen receptor splice variants expressed in castration-resistant prostate cancer require full-length androgen receptor. *Proceedings of the national academy of sciences*, 107(39), 16759-16765.
- Watson JV, Chambers SH, and Smith PJ. 1987. A programic approach to the analysis of DNA histograms with a definable G1 peak. *Cytometry*, 8, 1-8.
- Weber A, Borghouts C, Brendel C, Moriggl R, Delis N, Brill B, Vafaizadeh V, and Groner B. 2013. The inhibition of stat5 by a Peptide aptamer ligand specific for the DNA binding domain prevents target gene transactivation and the growth of breast and prostate tumor cells. *Pharmaceuticals*, 6(8), 960-987.
- Wender PA, Mitchell DJ, Pattabiraman K, Pelkey ET, Steinman L, and Rothbard, JB. 2000. The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(24), 13003-13008.
- Wu HC, Hsieh JT, Gleave ME, Brown NM, Pathak S, and Chung LW. 1994. Derivation of androgenindependent human LNCaP prostatic cancer cell sublines: role of bone stromal cells. *Int J Cancer*, 57, 406-412.

- Xu W, Allbritton N, and Lawrence DS. 2012. SRC kinase regulation in progressively invasive cancer. *PloS one*, 7(11), e48867.
- Xu J, Wu RC, O'Malley BW. 2009. Normal and cancer-related functions of the p160 steroid receptor co-activator (SRC) family. *Nature Reviews Cancer*, 9(9), 615-630.
- Xu Y, Chen SY, Ross KN and Balk SP. 2006. Androgens induce prostate cancer cell proliferation through mammalian target of rapamycin activation and post-transcriptional increases in cyclin D proteins. *Cancer Research*, 66, 7783-92.
- Yan G, Fukabori Y, Nikolaropoulos S, Wang F, McKeehan WL. 1992. Heparin-binding keratinocyte growth factor is a candidate stromal-to-epithelial-cell andromedin. *Molecular Endocrinology*, 6, 2123–2128.
- Yang X, Guo Z, Sun F, Li W, Alfano A, Shimelis H, Chen M, Brodie AM, Chen H, Xiao Z, Veenstra TD, and Qiu Y. 2011. Novel membrane-associated androgen receptor splice variant potentiates proliferative and survival responses in prostate cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 286(41), 36152-36160.
- Yang SH, Jaffray E, Senthinathan B, Hay RT, and Sharrocks AD. 2003. SUMO and transcriptional repression: dynamic interactions between the MAP kinase and SUMO pathways. *Cell Cycle*, 2(6), 528-530.
- Yeung F, Li X, Ellett J, Trapman J, Kao C, and Chung LW. 2000. Regions of prostate-specific antigen (PSA) promoter confer androgen-independent expression of PSA in prostate cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 275(52), 40846-40855.
- Yoon HG, and Wong J. 2006. The corepressors silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptor and nuclear receptor corepressor are involved in agonist-and antagonist-regulated transcription by androgen receptor. *Molecular Endocrinology*, 20(5), 1048-1060.
- Yu Z, Wu J, Wu S, Jia P, Tong Y, Wu X, Wang Y. 2009. A recombinant cell-permeable p53 fusion protein is selectively stabilized under hypoxia and inhibits tumor cell growth. *Cancer Lett*, 279 (1), 101–107.
- Yuan X, Cai C, Chen S, Yu Z, and Balk SP. 2013. Androgen receptor functions in castration-resistant prostate cancer and mechanisms of resistance to new agents targeting the androgen axis. *Oncogene*, doi:10.1038/onc.2013.235.
- Zhang Y, Linn D, Liu Z, Melamed J, Tavora F, Young CY, Burger AM, and Hamburger AW. 2008. EBP1, an ErbB3-binding protein, is decreased in prostate cancer and implicated in hormone resistance. *Molecular cancer therapeutics*, 7(10), 3176-3186.
- Zhao XY, Liu HL, Liu B, Willuda J, Siemeister G, Mahmoudi M, and Dinter H. 2008. Tomoregulin internalization confers selective cytotoxicity of immunotoxins on prostate cancer cells. *Translational oncology*, 1(2), 102-109.

- Zhao XY, Schneider D, Biroc SL, Parry R, Alicke B, Toy P, Xuan JA, Sakamoto C, Wada K, Schulze M, Müller-Tiemann B, Parry G, and Dinter H. 2005. Targeting tomoregulin for radioimmunotherapy of prostate cancer. *Cancer research*, 65(7), 2846-2853.
- Zhao Y, Goto K, Saitoh M, Yanase T, Nomura M, Okabe T, Takayanagi R, and Nawata H. 2002. Activation Function-1 Domain of Androgen Receptor Contributes to the Interaction between Subnuclear Splicing Factor Compartment and Nuclear Receptor Compartment. Identification of the p102 U5 small nuclear ribonucleoprotein particle-binding protein as a coactivator for the receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 277(33), 30031-30039.
- Zhou ZX, Sar M, Simental JA, Lane MV, and Wilson EM. 1994. A ligand-dependent bipartite nuclear targeting signal in the human androgen receptor. Requirement for the DNA-binding domain and modulation by NH2-terminal and carboxyl-terminal sequences. *Journal of Biological Chemistry*, 269(18), 13115-13123.
- Zhu W, Smith A, and Young CY. 1999. A nonsteroidal anti-inflammatory drug, flufenamic acid, inhibits the expression of the androgen receptor in LNCaP cells. *Endocrinology*, 140(11), 5451-5454.

8) Anhang

8.1) Zusätzliche Daten

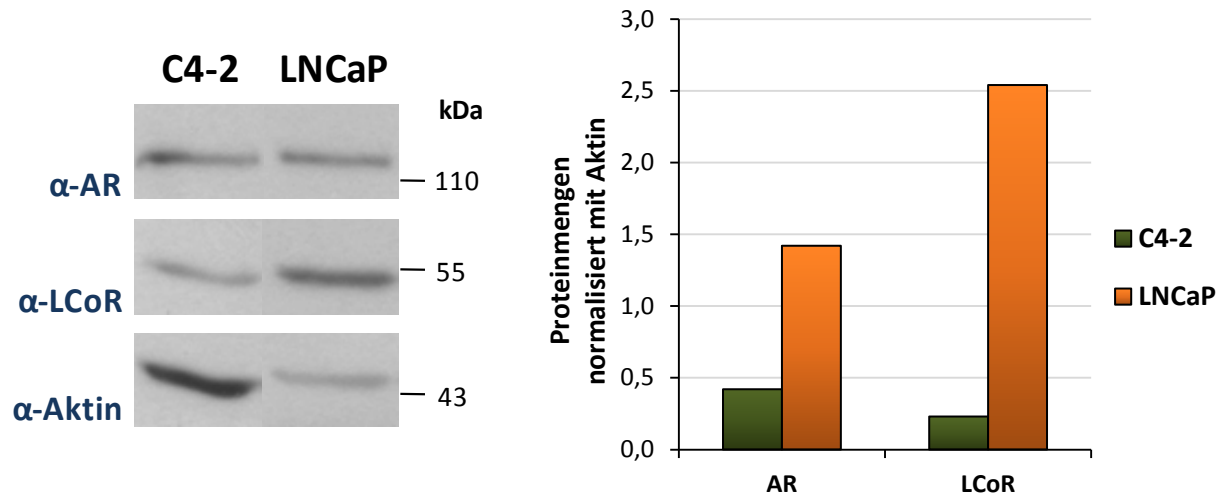


Abb. A1) In LNCaP-Zellen ist das Verhältnis von LCoR- zum AR-Protein größer als in C4-2-Zellen

Die Westernblot-Analysen gegen AR (α -AR), LCoR (α -LCoR) sowie Aktin (α -Aktin) zur Normalisierung wurden in C4-2- und LNCaP-Zellen durchgeführt. In Abb. 4.8 sind die LCoR-Proteinmengen nach Behandlung mit R1881 und PP2 gezeigt. Es wurden jeweils 300.000 Zellen in je zwei 6-Wells in Hormon-depletiertem Medium mit 0,1 % DMSO für 72 h kultiviert. Rechts sind die mit Aktin normalisierten und quantifizierten Proteinmengen dargestellt. In LNCaP-Zellen ist ca. dreifach mehr AR- und elffach mehr LCoR-Protein vorhanden als in C4-2-Zellen.

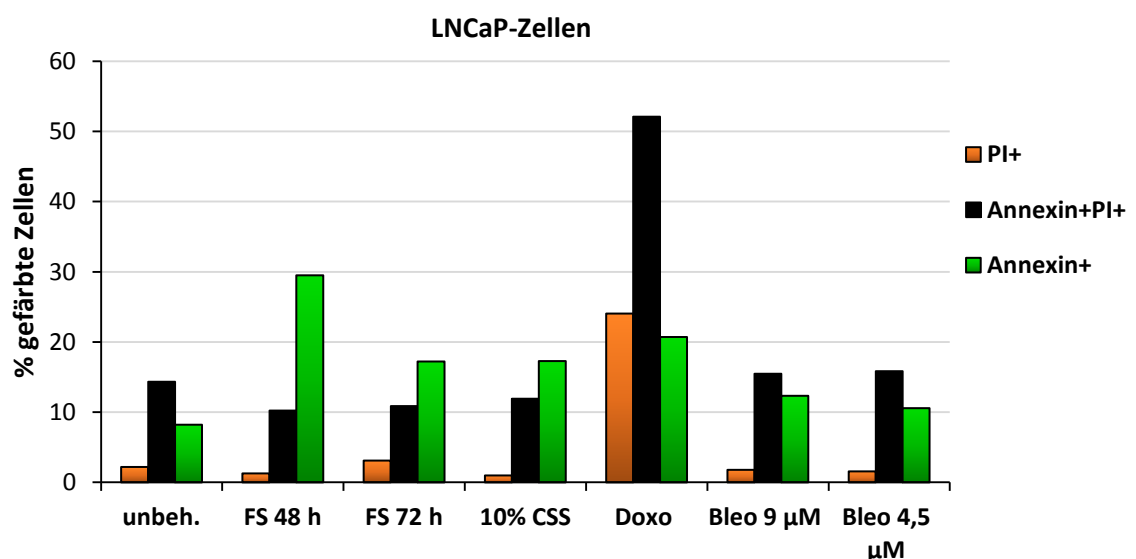
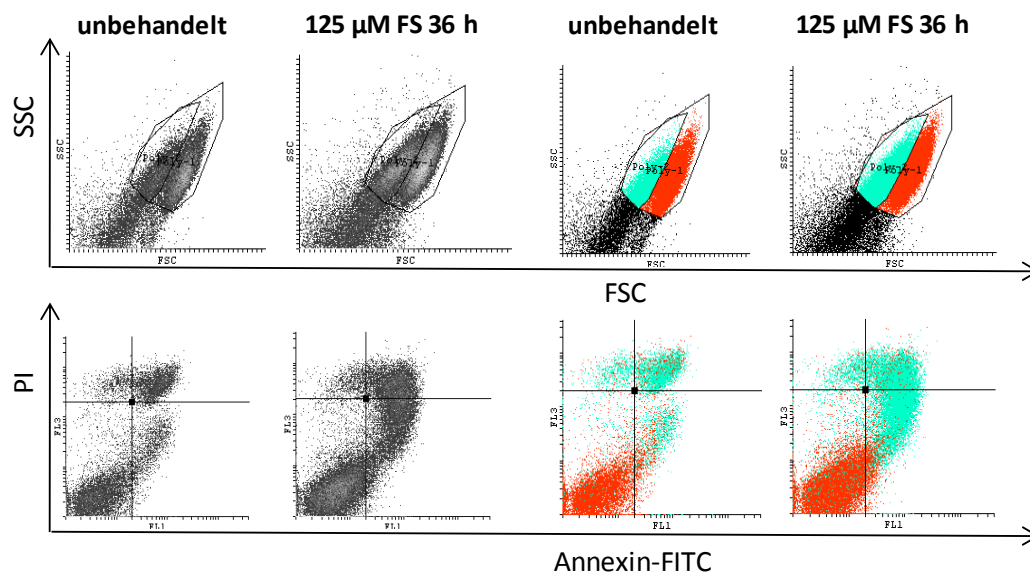


Abb. A2) Ermitteln einer Positivkontrolle zur Apoptose-Induktion in LNCaP-Zellen

Gezeigt ist jeweils der durch FACS-Analyse quantifizierte Anteil der Propidiumiodid(PI)-positiven, FITC-Annexin V sowie doppelt positiven Zellen. Die Zellen wurden für 72 h mit 125 μ M Flufenaminsäure (FS), Serumentzug (10 % *Charcoal Stripped Serum*, CSS im Medium), 8,6 μ M Doxorubicin (Doxo) sowie 4,5 oder 9 μ M Bleomycin (Bleo) behandelt. Dabei zeigt eine Inkubation mit 125 μ M FS für 48 h, was die AR-Proteinmenge verringert (Zhu *et al.*, 1999), die stärkste eindeutige

Induktion (3,6-fach) der Annexin V-positiven Zellen bei dreifacher Reduktion der Zelldichte (nicht gezeigt), ohne Einfluss auf die doppelt-gefärbten Zellen zu haben. Die dreitägige FS-Behandlung zeigt eine weniger starke Induktion, dafür aber einen leichten Anstieg der PI-haltigen Zellen. Ebenfalls effizient ist die Behandlung mit 8,6 μM Doxorubicin (Doxo, DNA-Fragmentierung nach 48 h in LNCaP-Zellen, Collins *et al.*, 2006) mit einer 2,5-fachen Annexin V-Erhöhung sowie circa sechsfachen Verringerung der Zelldichte (nicht gezeigt), wobei auch die doppelt- sowie PI-gefärbten Zellen massiv erhöht sind, was auf einen sehr späten Zeitpunkt der Apoptose bzw. Nekrose schließen lässt. Serumentzug (CSS, DNA-Fragmentierung nach 72 h, Nadiminty *et al.*, 2008) bewirkt eine leichte Induktion, während das DNA-Strangbruch induzierende Bleomycin (Bleo) kaum den Anteil apoptotischer Zellen erhöht, allerdings ist es auch nicht speziell für PCa-Zellen beschrieben.

A



B

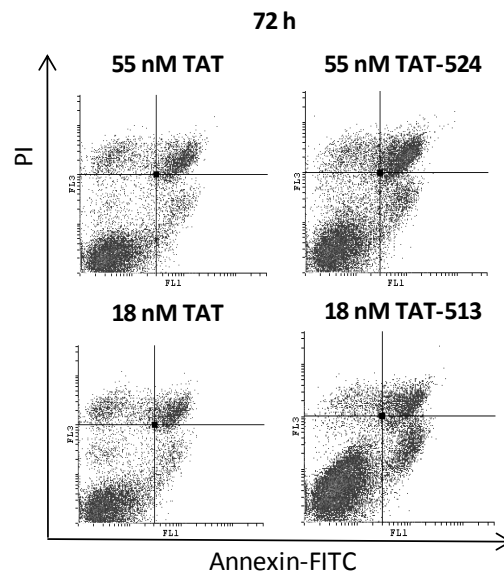


Abb. A3) Darstellung der Apoptose-Analyse in Dotplots

A) Am Beispiel von 125 μM FS für 36 h ist gezeigt, dass die apoptotischen Zellen (Annexin-FITC positiv, Quadrant unten rechts) der linken Population im FSC-SSC Dotplot entsprechen, das heißt, sie weisen eine höhere Granularität auf und sind etwas kleiner. Dieses Phänomen wurde von Kerr *et al.* (1972) beschrieben.

B) Darstellung der Dotplots nach 72 h Behandlung der LNCaP-Zellen aus Abb. 4.23B.

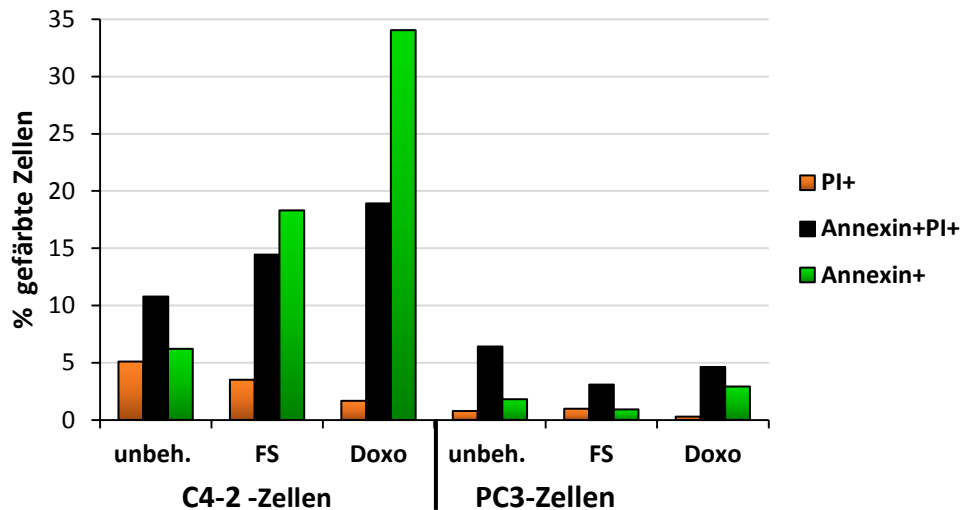


Abb. A4) Ermitteln der Positivkontrolle zur Apoptose-Induktion in C4-2- und PC3-Zellen

Gezeigt ist jeweils der durch FACS-Analyse quantifizierte Anteil der PI-positiven, FITC-Annexin V- sowie doppelt positiven Zellen nach 72 h Behandlung. 125 μ M Flufenaminsäure (FS) induziert in C4-2-Zellen nach 72 h vorwiegend die Annexin V-gefärbten Zellen (3-fach), ähnlich den LNCaP-Zellen. 3,5 μ M Doxorubicin (Doxo) erzielt ein höheres Level (5,5-fach), aber auch die doppelt-positiven Zellen sind deutlich erhöht (1,8-fach). Die Induktionsraten korrelieren mit der Wachstumshemmung (nicht gezeigt).

In PC3-Zellen senkt FS sogar die Apoptoserate, während Nekrose scheinbar etwas (1,3-fach) steigt. Dies ist ein Hinweis, dass FS durch den AR Abbau eine erhöhte Apoptoserate in LNCaP- und C4-2-Zellen bewirkt. Das Wachstum ist ebenfalls kaum beeinflusst (nicht gezeigt). 3,5 μ M Doxo erreicht nur geringfügig (1,6-fach) eine Erhöhung der frühen Apoptose trotz zweifacher Wachstumshemmung. Somit werden für C4-2-Zellen 125 μ M FS und für PC3-Zellen 3,5 μ M Doxo 72 h als Positivkontrolle für die FITC-Annexin V-Färbung gewählt.

8.2) PAB-CoR AS-Sequenzen

Blau: SUMO_{G97A}; Grün: TrxA; Orange/Pink: PA 513/524

TAT:

MKHHHHHHHPMSDYDIPTTENLYFQGAMGYGRKKRRQRRRGGS**SDQEAKPSTEDLGDKKEGEYIKLKVI**
GQDSSEIHFKVKMTTHLKKLKESYCQRQGVPMNSLRFLFEGQRIADNHTPKELGMEEDVIEVYQEQTG
AHSTVQFPGVDQLQQFMAYPYDVPDYASLGGHMSDKIIHLTDDSFDTDLKADGAILVDFWAIEWCGP

TAT-513:

MKHHHHHHHPMSDYDIPTTENLYFQGAMGYGRKKRRQRRRGGS**SDQEAKPSTEDLGDKKEGEYIKLKVI**
GQDSSEIHFKVKMTTHLKKLKESYCQRQGVPMNSLRFLFEGQRIADNHTPKELGMEEDVIEVYQEQTG
AHSTVQFPGVDQLQQFMAYPYDVPDYASP**CRSDAVWVSFSLVYCCA****VGPRFNYRLCSLLQRRFCL**

TAT-524:

MKHHHHHHHPMSDYDIPTTENLYFQGAMGYGRKKRRQRRRGGS**SDQEAKPSTEDLGDKKEGEYIKLKVI**
GQDSSEIHFKVKMTTHLKKLKESYCQRQGVPMNSLRFLFEGQRIADNHTPKELGMEEDVIEVYQEQTG
AHSTVQFPGVDQLQQFMAYPYDVPDYASLGGHMSDKIIHLTDDSFDTDLKADGAILVDFWAIEWCGP
GAPRPTVNMGLFFRETSPQSGPGITGAIGSWLHSIRKL

8.3) Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. Aria Baniahmad,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für die Arbeit erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe

und dass ich die gleiche, in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 19. August 2014

8.4) Danksagung

Am Ende dieser Arbeit möchte ich mich bei all den Menschen bedanken, die mich während meiner Doktorarbeit unterstützt haben. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ein besonderer Dank gilt hierbei meinem Betreuer Prof. Aria Baniahmad, der mir die Möglichkeit gab, dieses interessante Projekt zu bearbeiten. Er hatte immer ein offenes Ohr bzw. eine offene Tür und die häufigen fachlichen Diskussionen führten oft zu neuen Ideen und Lösungsansätzen. Durch seine humorvolle und optimistische Art hat er zu einem sehr angenehmen Arbeitsklima beigetragen.

Bei PD Dr. Christian Melle und dem Drittgutachter möchte ich mich für die Erstellung der Gutachten bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe. Die heitere Arbeitsatmosphäre im Labor war sehr viel wert. Ich danke Sophie, Flo, Dani, Wiebke, Julia, Mo und Susn für die große Hilfsbereitschaft, den Zusammenhalt und die gegenseitige Motivation. Im Speziellen halfen mir Flo und Sophie sehr geduldig bei Problemen weiter. Auch Gabi stand als gute Seele immer mit Rat und Tat zur Seite. Sie half so manches Mal aus, wenn z. B. dringend ein Puffer gebraucht wurde. Mit euch allen hatte ich eine wunderbare Zeit, wir hatten jede Menge Spaß und viele leckere Kuchen. Ich habe mich immer sehr wohl gefühlt. Auch die Frustration wurde geteilt und war somit weniger schlimm. Ein großes Dankeschön! Mein Dank gilt auch Karsten, der mir während seiner Bachelorarbeit eine riesige Hilfe gewesen ist. Auch bei den netten Mitarbeitern des Instituts für Biochemie II möchte ich mich für die wertvollen Ratschläge rundum das FACS bedanken!

Für Ihre Geduld beim Korrekturlesen möchte ich mich nochmals bei Flo und auch Susi bedanken.

Auch meiner Familie und meinen Freunden bin ich sehr dankbar für die Unterstützung und stete Motivation. Betti, Franzi und Susi, ihr wart echt gute Antreiber! Ihr alle habt immer an mich geglaubt und standet mir jederzeit mit aufmunternden Worten zur Seite!